

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

Doktorský studijní program  
**Patologie**

**Vybrané prognostické a prediktivní faktory nádorů  
adenohypofýzy u pacientů s akromegalií**

**Selected prognostic and predictive factors of pituitary  
tumours in patients with acromegaly**

**MUDr. Jiří Soukup**

Školitel: prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.  
Školitel konzultant: doc. MUDr. Filip Gabalec, Ph.D.

Hradec Králové, 2021

## **Prohlášení autora**

---

### **Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

**Hradec Králové, 2021**

MUDr. Jiří Soukup

**Jméno, příjmení a podpis autora**

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svým nejbližším, přátelům a spolupracovníkům za pomoc a podporu na dlouhé cestě, na jejímž konci vznikla tato práce.

Chtěl by na prvním místě poděkovat doc. Dr. Filipu Gabalcovi za to, že mě seznámil s problematikou onemocnění hypofýzy, uvedl mě do světa hypofyzární patologie a pomáhal mi klást si otázky a hledat na ně odpovědi v této práci. Chtěl bych poděkovat prof. Dr. Aleši Ryškovi za pomoc a ochotu při zpracování této práce, především v oblasti metodiky a analýzy výsledků a též bych mu chtěl poděkovat za neocenitelné postřehy při psaní odborných článků, jež v souvislosti s touto prací vznikly. Především mu však chci poděkovat za jeho odborné vedení, jež pomáhalo kultivovat mé vědeckovýzkumné dovednosti. Chtěl bych poděkovat MUDr. Heleně Hornychové, Ph.D. za neocenitelnou pomoc při zavádění a validaci imunohistochemických metodik použitých v této práci; bez jejího trpělivého a pečlivého úsilí při implementaci jednotlivých použitých protilátek by tato práce dozajista nevznikla. Chtěl bych poděkovat Světlaně Kopecké a Petře Satori, laborantkám z imunohistochemické laboratoře našeho ústavu, za vlastní realizaci imunohistochemických vyšetření použitých v této práci a též za jejich optimismus a podporu během celého projektu. Chtěl bych poděkovat RNDr. et Mgr. Lence Popovské za pomoc při vyhodnocení experimentálních dat. Chtěl bych poděkovat doc. MUDr. Tomáši Česákovi, Ph.D. a prof. MUDr. Davidu Netukovi za poskytnutí klinických údajů pro účely této práce. Chtěl bych poděkovat MUDr. Ľudmile Michnové a MUDr. Květoslavě Michalové, Ph.D. za zapůjčení histologických bločků případů zpracovaných v této práci. Chtěl bych poděkovat RNDr. Veronice Skarkové, Ph.D. za přátelství, inspiraci, pomoc a podporu, jichž se mi dostalo během mého postgraduálního studia, jako v odborném, tak v osobním životě.

A konečně, největší dík patří mé přítelkyni, MUDr. Monice Manethové, za osobní podporu, pomoc, inspiraci, neutuchající optimismus a povzbuzení při psaní této práce.

*Tato práce vznikla za podpory programů ASPIRE WII229983 (Pfizer UK) a AZV MZCR NV19-01-00435.*

*Věnováno památce MUDr. Witoldy Pencové.*



## **Obsah:**

<b>Poděkování.....</b>	<b>4</b>
<b>Obsah: .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>14</b>
<b>2. Souhrn .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Summary .....</b>	<b>18</b>
<b>4. Teoretický úvod do problematiky.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Obecný přehled problematiky pituitárních neuroendokrinních tumorů (PitNET, adenomy) hypofýzy a jejich patologická klasifikace .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.1 Nomenklatura primárních tumorů adenohypofýzy .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.2 Obecná epidemiologie PitNETů .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.3 Základní biologické rysy PitNETů .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.4 Principy klasifikace PitNETů dle WHO 2017 .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Problematika patologické klasifikace PitNETů s produkcí somatotropinu a jejich epidemiologie .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.1 Definice somatotropních PitNETů .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.2 Denzně granulované somatotropní tumory (DGST).....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.3 Řídce granulované somatotropní tumory (sparsely granulated somatotroph tumors, SGST) .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2.4 Somatotropní tumory s koexpresí prolaktinu .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2.5 Somatotropní tumory s koexpresí <math>\beta</math>TSH.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2.6 Acidofilní PitNET z kmenových buněk.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.7 Plurihormonální Pit1+ PitNET .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 Klinické projevy a terapie somatotropních PitNETů .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.1 Přehled klinických projevů somatotropních PitNETů .....</b>	<b>27</b>

<b>4.3.2 Přímé klinické projevy způsobené růstem tumoru .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.3 Přímé klinické projevy způsobené sekreční aktivitou tumoru.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.4 Laboratorní diagnostika akromegalie .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.5 Význam zobrazovacího vyšetření v diagnóze a terapii somatotropních PitNETů..</b>	<b>29</b>
4.3.5.1 Obecný význam zobrazovacího vyšetření u nádorů hypofýzy .....	29
4.3.5.2 Hodnocení velikosti somatotropních tumorů .....	29
4.3.5.3 Hodnocení invazivity somatotropních tumorů. ....	29
<b>4.3.6 Terapeutické cíle léčby akromegalie .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.7 Terapeutické postupy v léčbě akromegalie .....</b>	<b>30</b>
4.3.7.1 Přehled terapeutických postupů v léčbě akromegalie.....	30
4.3.7.2 Chirurgická léčba akromegalie .....	30
4.3.7.3 Farmakologická léčba akromegalie .....	31
4.3.7.4 Radioterapie u akromegalie .....	31
<b>4.4. Genetický podklad somatotropních PitNETů .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4.1 Obecné poznámky ke genetice somatotropních PitNETů .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4.2 Genetické změny v zárodečné linii vedoucí ke vzniku somatotropních PitNETů ...</b>	<b>32</b>
4.4.2.1 Syndrom izolovaných familiárních adenomů hypofýzy (FIPA) .....	32
<b>4.4.3 Genetické změny somatického charakteru v somatotropních PitNETech .....</b>	<b>33</b>
4.4.3.1 Obecný přehled změn somatického genomu v somatotropních PitNETech .....	33
4.4.3.2 Význam mutace genu GNAS1 v patogenezi a klinickopatologickém fenotypu somatotropních PitNETů .....	34
4.4.3.3 Význam mutace GHR v patogenezi somatotropních PitNETů .....	34
<b>4.4.4 Závěr.....</b>	<b>34</b>
<b>4.5 Prognostické faktory somatotropních PitNETů.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5.1 Obecný přehled prognostických faktorů ovlivňujících biologické chování somatotropních PitNETů.....</b>	<b>35</b>

<b>4.5.2 Klinické parametry ovlivňující prognózu somatotropních nádorů.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5.3 Patologické parametry ovlivňující prognózu somatotropních nádorů .....</b>	<b>36</b>
4.5.3.1 Obecný přehled patologických faktorů ovlivňujících prognózu somatotropních PitNETů .....	36
4.5.3.2 Prognostický význam mitotické aktivity v PitNETech .....	37
4.5.3.3 Prognostický význam imunohistochemicky detekované exprese p53 v PitNETech	38
4.5.3.4 Prognostický význam imunohistochemicky detekované exprese Ki67 v PitNETech .....	38
4.5.3.5 Prognostický význam histologického subtypu nádoru .....	40
4.5.3.6 Prognostická schémata WHO a Trouillas.....	41
<b>4.5.4 Závěr.....</b>	<b>43</b>
<b>4.6. Somatostatin, somatostatinová analoga, somatostatinové receptory, jejich struktura, funkce, exprese a prediktivní význam v somatotropních PitNETech .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6.1 Struktura a genetika somatostatinových receptorů .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6.2 Struktura a farmakokinetika somatostatinu .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6.3 Farmakologické charakteristiky klinicky užívaných somatostatinových analog (SSA).....</b>	<b>44</b>
<b>4.6.4. Obecné signální mechanismy a efektorové dráhy somatostatinového systému</b>	<b>45</b>
4.6.4.1 Buněčné účinky signalizace prostřednictvím SSTR.....	45
4.6.4.2 Přehled role jednotlivých subtypů SSTR v signálních drahách .....	45
<b>4.6.5 Kinetika somatostatinových receptorů.....</b>	<b>46</b>
<b>4.6.6 Expres a význam jednotlivých subtypů SSTR v buňkách Pit1<sup>+</sup> linie normální hypofýzy. ....</b>	<b>46</b>
<b>4.6.7 Expres jednotlivých subtypů SSTR v somatotropních PitNETech. ....</b>	<b>46</b>
4.6.7.1 Metodiky studia exprese SSTR, jejich výhody a limitace.....	46
4.6.7.2 Expres SSTR1 v somatotropních tumorech.....	47
4.6.7.3 Expres SSTR2 v somatotropních tumorech.....	48
4.6.7.4 Expres SSTR3 v somatotropních tumorech.....	49

4.6.7.5	Expresa SSTR4 v somatotropních tumorech.....	50
4.6.7.6	Expresa SSTR5 v somatotropních tumorech.....	51
4.6.7.7	Kritické zhodnocení exprese jednotlivých subtypů SSTR v somatotropních tumorech .....	51
<b>4.6.8</b>	<b>Klinické aspekty léčby SSA u somatotropních tumorů a klinický význam resistance na léčbu SSA .....</b>	<b>53</b>
4.6.8.1	Klinická odpověď somatotropních tumorů na léčbu SSA .....	53
4.6.8.2	Klinické prediktory odpovědi na léčbu SSA a jejich význam.....	53
4.6.8.3	Histologické prediktory odpovědi na léčbu SSA .....	54
4.6.8.4	Klinický význam resistance na léčbu SSA u somatotropních tumorů.....	54
<b>4.6.9</b>	<b>Potenciální mechanismy resistance na léčbu SSA v somatotropních PitNETech ...</b>	<b>54</b>
<b>4.6.10</b>	<b>Prediktivní význam exprese jednotlivých SSTR v somatotropních PitNETech. ..</b>	<b>55</b>
4.6.10.1	Obecné faktory ovlivňující odpověď na léčbu SSA .....	55
4.6.10.2	Prediktivní význam exprese SSTR1 .....	55
4.6.10.3	Prediktivní význam exprese SSTR2 .....	55
4.6.10.3.1	Přehled dat o prediktivním významu exprese SSTR2 .....	55
4.6.10.3.2	Kritické shrnutí prediktivního významu exprese SSTR2 .....	56
4.6.10.4	Prediktivní význam exprese SSTR3 .....	57
4.6.10.5	Prediktivní význam exprese SSTR5 .....	58
<b>4.6.11.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>58</b>
<b>4.7.</b>	<b>Dopamin, dopaminový agonisté (DA), dopaminový receptor D2, jeho struktura, funkce, exprese a prediktivní význam v somatotropních PitNETech .....</b>	<b>59</b>
<b>4.7.1</b>	<b>Struktura a genetika dopaminových receptorů.....</b>	<b>59</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Biochemie dopaminu a jeho farmakokinetika v hypotalamohypofyzárním systému .....</b>	<b>59</b>
<b>4.7.3</b>	<b>Dopaminový agonisté používání v léčbě PitNETů .....</b>	<b>59</b>
<b>4.7.4.</b>	<b>Obecné signální mechanismy a efektorové dráhy D2 dopaminového receptoru .....</b>	<b>60</b>

<b>4.7.5 Intracelulární kinetika D2DR receptoru.....</b>	<b>60</b>
<b>4.7.6 Expres a fyziologický význam dopaminové signalizace v normálních somatotropních a laktotropních buňkách.....</b>	<b>61</b>
<b>4.7.7 Expres D2DR v somatotropních PitNETech.....</b>	<b>61</b>
<b>4.7.8 Klinické aspekty léčby DA u somatotropních PitNETů a klinický význam resistance na léčbu DA .....</b>	<b>62</b>
4.7.8.1 Klinická odpověď somatotropních tumorů na léčbu DA. ....	62
4.7.8.2 Klinická odpověď somatotropních tumorů na léčbu kombinací SSA a DA. ....	63
4.7.8.3 Prediktory odpovědi na léčbu DA a jejich význam.....	63
4.7.8.4 Klinický význam resistance na léčbu DA u somatotropních tumorů .....	64
<b>4.7.9 Potenciální mechanismy resistance na léčbu DA v somatotropních PitNETech.....</b>	<b>64</b>
<b>4.7.10 Prediktivní význam exprese D2DR v somatotropních PitNETech.....</b>	<b>64</b>
<b>4.7.11 Závěr.....</b>	<b>66</b>
<b>4.8 Prognostický význam exprese E-cadherinu v somatotropních PitNETech a prediktivní význam stran odpovědi na léčbu SSA .....</b>	<b>66</b>
<b>4.8.1 Struktura a funkce E-cadherinu a vybraných asociovaných proteinů .....</b>	<b>66</b>
4.8.1.1 Struktura E-cadherinu.....	66
4.8.1.2 Struktura a funkční význam extracelulárních domén E-cadherinu.....	66
4.8.1.3 Struktura a funkční význam intracelulární domény E-cadherinu a s ní asociovaných proteinů.....	67
<b>4.8.2 Expres E-cadherinu v buňkách normální hypofýzy.....</b>	<b>68</b>
<b>4.8.3 Expres E-cadherinu a asociovaných proteinů v somatotropních tumorech hypofýzy a jejich význam .....</b>	<b>68</b>
4.8.3.1 Expres E-cadherinu v jednotlivých subtypech somatotropních tumorů hypofýzy a její klinický a prognostický význam.....	68
4.8.3.2 Analýza metodických aspektů stanovení exprese E-cadherinu .....	70
4.8.3.3 Prediktivní význam exprese E-cadherinu pro odpověď na léčbu SSA.....	71

<b>4.8.4 Mechanismy snížené exprese E-cadherinu v somatotropních PitNETech.....</b>	<b>72</b>
<b>4.8.5 Závěr.....</b>	<b>72</b>
<b>4.9 Prognostický význam exprese arylhydrokarbonreceptor-interagujícího proteinu (AIP) v somatotropních PitNETech a prediktivní význam stran odpovědi na léčbu SSA .....</b>	<b>73</b>
<b>4.9.1 Arylhydrokarbonreceptor-interagující protein (AIP), jeho struktura a význam v somatotropních tumorech.....</b>	<b>73</b>
<b>4.9.2 Normální funkce AIP a interakce se signálními drahami SSTR systému .....</b>	<b>73</b>
<b>4.9.3 Genetické faktory spojené s dysfunkcí AIP v somatotropních tumorech.....</b>	<b>73</b>
<b>4.9.4 Interakce AIP se signálními drahami SSTR systému .....</b>	<b>73</b>
<b>4.9.5 Význam exprese AIP ve somatotropních tumorech bez zárodečné mutace AIP ....</b>	<b>74</b>
4.9.5.1 Prediktivní a prognostický význam exprese AIP v somatotropních tumorech .....	74
4.9.5.2 Metodické poznámky k hodnocení exprese AIP .....	74
<b>4.9.6 Závěr.....</b>	<b>75</b>
<b>5. Cíle disertační práce.....</b>	<b>76</b>
<b>6. Materiál a metody .....</b>	<b>77</b>
<b>6.1 Soubor pacientů.....</b>	<b>77</b>
6.1.1 Registr RESET a klinické údaje získané z registru .....	77
6.1.2 Vzorky tumorů použité ve studii.....	78
<b>6.2 Metodika morfologického vyšetření .....</b>	<b>78</b>
<b>6.3 Imunohistochemické vyšetření tumorů .....</b>	<b>79</b>
<b>6.4 Hodnocení imunohistochemického vyšetření.....</b>	<b>80</b>
6.4.1 Hodnocení exprese prolaktinu a $\beta$ TSH .....	80
6.4.2 Hodnocení exprese cytokeratinu 18, cytokeratinu 8/18 a cytokeratinu AE1/3 .....	81

6.4.3 Hodnocení exprese Ki67 a p53 .....	84
6.4.4 Hodnocení exprese SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR5 a D2DR .....	84
6.4.5 Hodnocení exprese E-cadherinu a AIP .....	87
6.4.6 Hodnocení exprese GATA3 .....	89
6.5 Subklasifikace nádorů podle patologických a radiologických parametrů.....	89
6.6 Subklasifikace nádorů na proliferující a neproliferující a grade dle Trouillas.....	89
6.7 Informatické zpracování a statistická analýza souboru .....	90
7. Výsledky .....	91
7.1 Obecné klinicko-patologické charakteristiky testovaného souboru .....	91
7.2 Klinickopatologické charakteristiky podsouboru s neoadjuvantní farmakologickou léčbou SSA/DA a její vliv na patologické parametry tumorů .....	94
7.2.1 Neoadjuvantní léčba SSA první generace a její vliv na patologické parametry tumorů .....	94
7.2.2 Neoadjuvantní léčba cabergolinem a její vliv na patologické parametry tumorů ..	98
7.2.3 Morfologické změny v tumorech u nemocných předléčených analogy .....	98
7.3 Analýza prognostického významu jednotlivých studovaných parametrů souboru ...	99
7.3.1 Obecné poznámky k analýze prognostických faktorů .....	99
7.3.2 Korelační analýza zkoumaných faktorů s potenciálním prognostickým významem .....	99
7.3.3 Analýza významu kategorických proměnných (pohlaví, proliferativita, invaze, grade dle Trouillas) na klinickopatologické parametry tumorů .....	101
7.3.4 Analýza významu histologického subtypu tumoru .....	108
7.3.4.1 Cytokeratin 18 negativní tumory .....	108
7.3.4.2 Patologické charakteristiky jednotlivých histologických subtypů nádorů .....	115

7.3.4.3 Analýza ROC-křivek pro SSTR2A, SSTR3, SSTR5 a E-cadherin ve skupině SGST a non-SGST .....	125
7.3.4.4 Význam koexprese $\beta$ TSH v podskupině SGST .....	126
7.3.4.5 Vztah exprese D2DR a prolaktinu v jednotlivých histologických podtypech.....	127
7.3.4.6 Klinické charakteristiky jednotlivých histologických subtypů nádorů .....	127
7.3.4.7 Korelační analýza jednotlivých histologických subtypů .....	131
<b>7.3.5 Analýza patologických faktorů podmiňujících velikost tumorů.....</b>	<b>134</b>
<b>7.4 Analýza faktorů s potenciálním prediktivním významem .....</b>	<b>142</b>
<b>7.4.1 Deskriptivní charakteristiky podskupiny pacientů léčených SSA, u kterých byla prováděna analýza prediktivních faktorů.....</b>	<b>142</b>
<b>7.4.2 Analýza podskupiny pacientů s konkomitantní léčbou dopaminovými agonisty a význam exprese D2DR .....</b>	<b>144</b>
<b>7.4.3 Korelační analýza potenciálních terapeutických prediktorů.....</b>	<b>145</b>
<b>7.4.4 Analýza potenciálních klinických prediktorů léčebné odpovědi .....</b>	<b>145</b>
<b>7.4.5 Analýza histologických prediktorů odpovědi na léčbu.....</b>	<b>146</b>
7.4.5.1 Analýza významu exprese somatostatinových receptorů a význam poměrů jednotlivých receptorů .....	146
7.4.5.2 Analýza významu exprese E-cadherinu .....	146
7.4.5.3 Analýza významu exprese AIP.....	147
7.4.5.4 Analýza dalších histologických faktorů .....	147
<b>7.4.6 Analýza významu histologického subtypu pro léčebnou odpověď.....</b>	<b>149</b>
7.4.6.1 Obecné poznámky k histologické povaze souboru.....	149
7.4.6.2 Odpověď na léčbu u pacientů s SGST.....	150
7.4.6.3 Odpověď na léčbu u pacientů s non-SGST .....	150
<b>8. Diskuse.....</b>	<b>154</b>
<b>8.1 Úvodní poznámky k interpretaci výsledků .....</b>	<b>154</b>
<b>8.2 Epidemiologické parametry studované kohorty, vliv pohlaví a věku pacientů na klinickopatologické parametry tumorů .....</b>	<b>154</b>



<b>8.3 Histologická subtypizace vyšetřených nádorů.....</b>	<b>157</b>
<b>8.4 Klinickopatologický fenotyp jednotlivých histologických subtypů .....</b>	<b>161</b>
<b>8.5 Význam exprese AIP, Ki67, p53, mitotické aktivity a grade dle Trouillas .....</b>	<b>173</b>
<b>8.6 Faktory predikující odpověď na léčbu SSA .....</b>	<b>178</b>
<b>8.7 Metodické limitace této práce, problematika kombinační léčby SSA a DA ve studii .....</b>	<b>183</b>
<b>9. Závěr.....</b>	<b>186</b>
<b>10. Seznam popisků tabulek a obrazové dokumentace.....</b>	<b>188</b>
<b>10.1 Seznam popisků tabulek .....</b>	<b>188</b>
<b>10.2 Seznam popisků obrázků.....</b>	<b>191</b>
<b>10.3 Seznam popisků grafů.....</b>	<b>192</b>
<b>11. Seznam citací použité literatury.....</b>	<b>193</b>

## 1. Seznam použitých zkratk

DAB - 3,3'-diaminobenzidin

$\beta$ TSH – beta-podjednotka thyreotropního hormonu

ATKB – acidofilní tumor z kmenových buněk

ACTH – adrenokortikotropní hormon

ADAM – „a disintegrin and metalloproteinase“

AHR – arylhydrokarbonreceptor

AIP – arylhydrokarbonreceptor-interagující protein

ANOVA – „analysis of variance“

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CBTRUS – „Central Brain Tumor Registry of the United States“

DA – dopaminový agonista

D1DR, D2DR – D<sub>1</sub> a D<sub>2</sub> dopaminový receptor

D2L – dlouhá („long“) sestrňhová forma D2DR

D2S – krátká („short“) sestrňhová forma D2DR

DGST – denzně granulovaný somatotropní tumor

E-cad/CTF2 – „E-cadherin C-terminal fragment 2“

EGFR – „epidermal growth factor receptor“

EPPG – „European Pituitary Pathology Group“

FIPA – „familial isolated pituitary adenoma“

FSH – folikuly stimulující hormon

FÚP – Fingerlandův ústav patologie

GFAP – „glial fibrillary acidic protein“

GHR – „growth hormone receptor“

GHRH – „growth hormone releasing hormone“

GSP – onkogenní forma G<sub>as</sub> proteinu

GTP – guanosin trifosfát

HIER – „heat induced epitope retrieval“

IGF1 – „insulin-like growth factor 1“

IHC – imunohistochemie

ISH – in situ hybridizace  
kDa – kilodalton  
KW – Kruskal-Wallisův test  
LAR – „long acting repeatable“  
LH – luteinizační hormon  
MAO – monoaminoxidáza  
MMP – matrix metaloproteináza  
mRNA – „messenger RNA“  
MW – Mann-Whitneyův test  
NGS – „next generation sequencing“  
Non-SGST – tumory jiného subtypu, nežli řídce granulované somatotropní tumory  
NSE – neuron specifická enoláza  
oGTT - orální glukózový toleranční test  
OR – „Odds ratio“  
PEG forma – léková forma vázaná na polyetylglykol  
PitNET – pituitární neuroendokrinní tumor  
PPPT – plurihormonální Pit1<sup>+</sup> tumor  
RESET – Registr sellárních tumorů  
ROC – „receiver operating characteristics“  
RT-q-PCR – reverzně transkriptázová kvantitativní polymerázová řetězová reakce  
SD – směrodatná odchylka  
SF1 – „Steroidogenic factor 1“  
SGST – řídce granulovaný somatotropní tumor  
SLT – somatolaktotropní tumor  
SSA – somatostatinový analog  
SSTR1-5 – somatostatinové receptory 1-5  
STH – somatotropní hormon  
VEGF – „vascular endothelial growth factor“  
WB – „western blot“  
WHO – Světová zdravotnická organizace

## 2. Souhrn

Nádory adenohypofýzy spojené s akromegalií (somatotropní adenomy, somatotropní pituitární neuroendokrinní tumory – PitNETy) jsou vzácným onemocněním, které je spojeno s významnou morbiditou. Zatímco u části pacientů je primární chirurgická léčba kurativní, část pacientů nedosáhne po operativním zákroku úzdravy a nutně je použít adjuvantní radioterapii anebo farmakoterapii somatostatinovými analogy (SSA). Tato léčba je ekonomicky nákladná, zatímco terapeutická odpověď není pravidlem. Cílem této práce byla přesná klinickopatologická charakterizace pacientů s akromegalií (n=110) v REgistru SELLárních Tumorů (RESET) a dále explorační potenciálních faktorů spojených s agresivnějším klinickým fenotypem onemocnění (velikost, invazivita, biochemické vlastnosti tumorů) a potenciálních prediktorů terapeutické odpovědi na somatostatinová analoga první generace. Za tímto účelem byla provedena extenzivní imunohistochemická analýza případů zahrnující stanovení patologického subtypu tumoru (exprese cytokeratinů, prolaktinu a  $\beta$ TSH), stanovení ukazatelů proliferativní aktivity (Ki67 a p53), stanovení exprese jednotlivých podtypů somatostatinových receptorů (SSTR1, 2A, 3 a 5), D2 dopaminového receptoru a dalších proteinů s potenciálním prognostickým a prediktivním významem (AIP, E-cadherin).

Naše práce prokázala signifikantně nižší expresi E-cadherinu, SSTR2A, SSTR3 a vyšší expresi SSTR5 ve skupině řídce granulovaných somatotropních tumorů (SGST) ve srovnání se skupinou tumorů jiných nežli řídce granulovaných. Pacienti s řídce granulovanými tumory byli signifikantně častěji mladší, nelišili se však v jiných klinických parametrech, včetně velikosti a biochemických vlastností. Redukovaná exprese E-cadherinu byla nejkonzistentnějším patologickým znakem SGST. V naší práci jsme identifikovali celkem 9 tumorů (8,2 %) bez exprese cytokeratinů nezbytné k subklasifikaci dle současných platných schémat. Tyto tumory se neodlišovaly signifikantně od ostatních patologických podskupin a bylo možné je dále zařadit na podkladě morfologie a imunoprofilu. Pacienti s invazivními tumory byli signifikantně mladší, tumory byly větší a vykazovaly signifikantně nižší expresi D2 dopaminového receptoru. Při použití gradingového schématu Jacqueline Trouillas(1) byli pacienti s nejagresivnějšími tumory (kategorie 2b) též signifikantně mladší a tyto tumory byly signifikantně větší a exprimovaly nižší hladiny SSTR2A. Větší tumory ze skupiny somatolaktotropních tumorů exprimovaly nižší hladiny SSTR3 a D2 dopaminového receptoru. Celkem u 31 pacientů (28 %) bylo možné analyzovat odpověď na léčbu SSA první generace – ta byla hodnocena jako procentuální míra redukce hladiny IGF1 na konci

hodnoceného intervalu. Medián časového intervalu od zahájení léčby SSA do výstupní analýzy hladiny IGF1 byl 10,6 měsíce, průměrná délka pak 12,3 měsíce. Starší pacienti, pacienti s vyššími vstupními hladinami IGF1, menšími rozměry tumorů a vyšší expresí E-cadherinu a SSTR2A vykazovali lepší léčebnou odpověď. SGST subtyp byl asociován s horší léčebnou odpovědí, tato asociace však byla nesignifikantní ( $p=0,06$ ); všechny tumory s nízkou expresí E-cadherinu ve skupině se špatnou léčebnou odpovědí však patřil s SGST subtypu a exprese E-cadherinu se nelišila mezi skupinami s dobrou a špatnou terapeutickou odpovědí po zohlednění histologického subtypu. Z těchto důvodů nepovažujeme E-cadherin za nezávislý prediktor léčebné odpovědi. Nepozorovali jsme rozdíly v expresi AIP mezi pacienty s dobrou a špatnou terapeutickou odpovědí. U pacientů s SGST se jako pozitivní prediktor odpovědi jevil vyšší věk, vyšší exprese SSTR2A a nižší index Ki67. U pacientů s non-SGST pak vyšší exprese SSTR5.

Naše práce tedy v souladu s předchozí literaturou demonstrovala diferenciální expresi SSTR v jednotlivých nádorových podtypech. Jako dosud nepopsané zaznamenala práce vztah mezi invazivitou tumoru a expresí D2 dopaminového receptoru a spolu s expresí SSTR3 poukázala na potenciální prognostický význam u somatolaktotropních tumorů. Oproti literatuře jsme nepotvrdili prediktivní význam AIP a nezávislý význam E-cadherinu. Jako první jsme též zaznamenali vztah mezi klinickopatologickým fenotypem somatotropních PitNETů a gradingovým systémem Trouillas et al.

### 3. Summary

Pituitary tumours in patients with acromegaly (somatotroph adenomas, pituitary neuroendocrine tumours – PitNETs) are a rare disease with significant morbidity and high impact on economic resources of the health care system. The surgery is the first line of treatment, and while it cures a subset of the patients, another therapeutical approach combining radiotherapy and pharmacotherapy is needed in the rest. This usually includes treatment with costly somatostatin analogues (SSA). On the opposite, the therapeutic response to SSA is not a rule. This work aimed to perform precise clinicopathological characterisation of available tissue samples of PitNETs in acromegalic patients (n=110) from REgistr SELLárních Tumorů (RESET registry) and further explore potential factors related to clinically aggressive disease phenotype (tumour size, invasion, biochemical parameters) and factors that might predict therapeutic response to the first generation SSA. An extensive immunohistochemical evaluation was performed: tumours were histologically subclassified (expression of cytokeratins, prolactin,  $\beta$ TSH) and proliferative activity was assessed (Ki67, p53, mitotic count) as well as expression of possible pharmacological targets (SSTR1, 2A, 3, 5, D2 dopamine receptor) and another suggested predictors (AIP, E-cadherin).

In a subgroup of sparsely granulated somatotroph tumours (SGST), we demonstrated significantly higher expression of SSTR5 and lower expression of E-cadherin, SSTR2A and SSTR3 compared to the other tumour subtypes. The patients with SGST were significantly younger but showed no other differing clinical features (including size, invasion rate and biochemical profile). Reduced expression of E-cadherin was the most characteristic feature of SGST subtype. We identified 9 tumours (8,2 %), difficult to classify using standard schemes due to the lack of cytokeratin expression. These tumours did not differ significantly from other tumour subtypes and it was possible to perform further typisation based on the morphology and hormonal expression. Patients with invasive tumours were significantly younger and showed lower expression of D2 dopamine receptor. Using the grading scheme proposed by Trouillas et al.(1), we demonstrated that patients with the most aggressive tumours (grade 2b) were significantly younger, the tumours were significantly larger and expressed lower levels of SSTR2A. Large somato-lactotroph tumours showed lower expression of SSTR3 and D2 dopamine receptor. We analysed the treatment response to the first generation SSA in 31 patients (28 %). Treatment response was assessed as a percentual reduction of IGF1 levels after the SSA treatment interval. Median duration of the treatment

period was 10.6 months; the average duration was 12.3 months. Older patients, patients with higher IGF1 levels and smaller tumour size at the time of diagnosis and patients with higher expression of SSTR2A and E-cadherin showed significantly better treatment response. SGST subtype was associated with more unsatisfactory outcome; this however, did not reach statistical significance ( $p=0,06$ ). However, all the tumours with low E-cadherin expression in the poor responder subgroup belonged to the SGST subset, and we found no differences in E-cadherin expression between treatment subgroups when the histological subtype was considered. Thus, we did not consider E-cadherin as an independent predictor of SSA treatment response. In contrast with literature, we did not observe differences in immunohistochemical expression of AIP between treatment response subgroups. In the SGST subset, higher age, higher expression of SSTR2A and lower Ki67 index was predictive of good treatment response. In non-SGST subset, higher expression of SSTR5 was a positive predictor.

Our work, in line with previous literature, demonstrated a differential expression among individual, histologically defined tumour subsets. Yet undescribed in previous studies, we observed a relationship between D2 dopamine receptor expression and invasivity and prognostic significance of D2 dopamine receptor and SSTR3 in the subset of somatolactotroph tumours, although these findings require further validation. In contrast with the previous reports, we could not verify the independent prognostic significance of E-cadherin and AIP immunohistochemical expression. Also, this work is the first of its kind to correlate clinicopathological phenotype of somatotroph tumours and Trouillas grading system on such a large sample of somatotroph PitNETs.

*„A beginning is a very delicate time.“*

*- Frank Herbert, Dune*

#### **4. Teoretický úvod do problematiky**

##### **4.1 Obecný přehled problematiky pituitárních neuroendokrinních tumorů (PitNET, adenomy) hypofýzy a jejich patologická klasifikace**

###### **4.1.1 Nomenklatura primárních tumorů adenohypofýzy**

Vzhledem k biologické povaze (neuroendokrinní tumory jsou analogické s neuroendokrinními tumory v jiných orgánech) a klinickým vlastnostem (obtížná predikce klinického chování, lokální agresivita části tumorů způsobující významnou morbiditu) byla pro adenomy hypofýzy navržena nová terminologie – pituitární neuroendokrinní tumor (PitNET; návrh International Pituitary Pathology Club)(2). Přestože tato terminologie není implementována v současně platné WHO klasifikaci endokrinních nádorů(3), považuje ji autor za konceptuálně správnou a klinicky opodstatněnou a bude proto používána v rozsahu nadcházejícího textu.

###### **4.1.2 Obecná epidemiologie PitNETů**

PitNETy představují nejčastější primární nádory hypofýzy a adenohypofýzy. Z údajů centrálního registru mozkových tumorů Spojených států amerických (Central Brain Tumor Registry of the United States, CBTRUS) z období mezi roky 2011-2015 představují 16 % intrakraniálních nádorů(4). Odhadovaná průměrná populační prevalence je až 16,7 % na podkladě metaanalýzy několika sekčních a radiologických studií zahrnujících kromě klinicky manifestních nádorů též asymptomatické a náhodně objevené léze(5). Incidence klinicky symptomatických PitNETů je nicméně nižší a pohybuje se okolo 2,7-4 případů/100 000 obyvatel/rok v závislosti na demografické kohortě(6, 7). PitNETy se vyskytují častěji u žen v poměru 1,2:1, věkový medián je 51 let a incidence roste s věkem(4). PitNETy zastoupené v sekčních a radiologických studiích jsou ve většině případů klinicky asymptomatické mikroadenomy a představují incidentální nález(5).

###### **4.1.3 Základní biologické rysy PitNETů**

PitNETy hypofýzy jsou neuroendokrinní tumory(3). Neuroendokrinní tumory se vyznačují přítomností strukturálních proteinů charakteristických pro epitelální tkáň a současnou přítomností proteinů typických pro nervovou tkáň(8). Epitelální diferenciaci PitNETů odráží exprese intermediárních filament z rodiny cytokeratinů a membránové adhezivní molekuly E-cadherinu. Nejčastěji exprimovaným cytokeratinem je nízkomolekulární bazický cytokeratin



8, jenž lze identifikovat v 70 až 90 % PitNETů protilátkou CAM5.2. Bazické cytokeratiny vytváří v buňkách tetramerní heteropolymery s acidickými cytokeratiny; v PitNETech je nejčastějším partnerem cytokeratinu 8 acidický cytokeratin 18(3, 9). V části tumorů lze dále prokázat expresi nízkomolekulárního acidického cytokeratinu 20 (38 %, v závislosti na histologickém subtypu) a bazického cytokeratinu 7 (10 %)(10). E-cadherin (*CDH1*, uvomorulin) je adhezivní transmembránová molekula z rodiny cadherinů exprimovaná v epiteliálních buňkách. Význam E-cadherinu v PitNETech, především somatotropních, byl extenzivně studován a je blíže diskutován v 4.8. Neurální diferenciaci je charakterizována expresí synaptophysinu, chromograninu A, neuron specifické enolázy (NSE) a intermediárních filament z rodiny neurofilament(11). Synaptophysin je membránový protein neuronálních synaptických vezikul; je považován za nejsenzitivnější neuroendokrinní marker (v kontextu neuroendokrinních tumorů obecně) a jeho expresi lze detekovat až v 92 % PitNETů(11). Chromogranin A je součástí neuroendokrinních sekrečních granúl a jeho expresi lze detekovat téměř ve všech adenomech hypofýzy (až 100 %)(9). NSE je enzym exprimovaný v neuronech, který je přítomný též v PitNETech (až 80 %)(9).

#### **4.1.4 Principy klasifikace PitNETů dle WHO 2017**

PitNETy hypofýzy jsou pro klinické a patologické účely klasifikovány dle v současnosti platného schématu Světové zdravotnické organizace (World Health Organisation, WHO) z roku 2017 (tabulka 4.1)(3). Dle velikosti se PitNETy rozdělují na mikroadenomy (<10 mm v průměru), makroadenomy (10-40 mm v průměru a obří (giant) adenomy (>40 mm v průměru). V závislosti na klinické prezentaci jsou PitNETy buďto „tiché“ - v případě absence klinických známek nadprodukce specifických hormonů -, anebo endokrinologicky manifestní(3). Vlastní histologická klasifikace představuje integrativní proces, jenž bere v potaz morfologii tumoru a především proteinovou expresi detekovanou imunohistochemickými metodami(3, 12-16). Elektronová mikroskopie může hrát roli v subklasifikaci některých vzácných subtypů PitNETů, její význam byl však v současnosti ve většině případů nahrazen imunohistochemickým vyšetřením.

Analogicky s normální hypofýzou se PitNETy rozdělují podle produkce jednotlivých hormonálních substancí, exprese transkripčních faktorů, které během embryogeneze řídí diferenciaci jednotlivých buněčných populací, a též podle exprese cytokeratinových intermediárních filament (CAM5.2 anebo cytokeratin 18)(3, 9, 12, 16). Exprese transkripčních faktorů je pro účely typizace senzitivnější, neboť tyto lze prokázat i ve většině PitNETů bez imunohistochemicky prokazatelné hormonální produkce(3, 16, 17).

K hodnocení množství sekrečních granul („denzity“) se užívá hodnocení rozsahu imunohistochemické positivity a morfologického vzhledu (tinkční vlastnosti cytoplasmy), na rozdíl od elektronmikroskopického vyšetření, jež v minulosti tuto vlastnost definovalo. Současné klasifikační schéma PitNETů hypofýzy je uvedeno v Tabulce 4.1(3).

Kortikotropní PitNETy jsou definovány jako nádory, které exprimují transkripční faktor Tbox19 (Tpit) a případně ACTH. Gonadotropní PitNETy jsou definovány expresí transkripčních faktorů SF1, GATA3 a dále exprimují v různém rozsahu a-podjednotku a b-podjednotku LH či FSH. Thyreotropní PitNETy exprimují transkripční faktory Pit1, GATA3 a dále a-podjednotku a  $\beta$ -podjednotku TSH. Prolaktinomy exprimují Pit1 a prolaktin. Somatotropní PitNETy exprimují Pit1, STH a někdy též prolaktin a  $\beta$ TSH. Bližší klasifikace somatotropních PitNETů je pojednána v sekci 4.3. Dvojité („double“) PitNETy jsou kolizní tumory tvořené dvěma klonálně separátními PitNETy, jež produkují různé hormony. Plurihormonální PitNETy produkují různé kombinace hormonů napříč třemi původními liniemi diferenciace definovanými expresí transkripčních faktorů Pit1, Tbox19 a SF1(3, 12, 16, 18). Prevalence jednotlivých hormonálních subtypů PitNETů je uvedena v tabulce 4.2.

Prognostickou kategorií je v současnosti zrušená jednotka atypického adenomu, která byla zavedena ve WHO klasifikaci z roku 2004 a měla definovat tumory s agresivnějším chováním. Tato problematika je v detailu diskutována v sekci 4.5.3.6.

Kategorie karcinomu hypofýzy je definována přítomností hematogenních metastáz či porogenních metastáz v likvorových cestách. Karcinomy mohou být hormonálně tiché anebo hormonálně aktivní, nejčastěji produkovaným hormonem je prolaktin(3, 12, 16).

## **4.2 Problematika patologické klasifikace PitNETů s produkcí somatotropinu a jejich epidemiologie**

### **4.2.1 Definice somatotropních PitNETů**

Somatotropní PitNETy jsou definovány expresí Pit1 a somatotropinu (STH); v části buněk PitNETů může být koexprimován prolaktin a méně často též  $\beta$ TSH. PitNETy s produkcí STH dělíme dle WHO klasifikace na denzně granulované, řídce granulované, somato-laktotropní, mamosomatotropní, acidofilní PitNETy z kmenových buněk, plurihormonální a plurihormonální Pit1<sup>+</sup> adenom (dříve tzv. silent subtype 3 adenom)(12, 15, 19). Frekvence zastoupení jednotlivých podskupin u pacientů s akromegalií je uvedena v tabulce 4.3.

### **4.2.2 Denzně granulované somatotropní tumory (DGST)**

Denzně granulované PitNETy se vyznačují perinukleární distribucí intermediárních cytokeratinových filament, objemnou eosinofilní cytoplasmou a silnou imunohistochemickou pozitivitou STH.

Tabulka 4.1 – Klasifikační schéma PitNETů (dle WHO). Pojem PitNET označuje WHO klasifikace standartně termínem adenom. Z důvodů uvedených v sekci 4.1.1 byla nomenklatura tabulky upravena pro účely této práce.

<b>Tumory z Pit1<sup>+</sup> linie</b>		Imunohistochemický profil
Somatotropní tumory	Denzně granulovaný somatotropní tumor (DGST)	STH, perinukleární pozitivita cytokeratinu 18 v > 30 % buněk
	Řídce granulovaný somatotropní tumor (SGST)	STH, fibrózní tělíska pozitivní v cytokeratinu 18 v > 70 % buněk
	Somato-laktotropní tumor	Expres prolaktinu a STH ve dvou buněčných populacích
	Mammosomatotropní tumor	Koexpres prolaktinu a STH ve stejné buněčné populaci
Laktotropní tumory	Denzně granulovaný prolaktinom	Difúzní cytoplasmatická pozitivita prolaktinu
	Řídce granulovaný prolaktinom	Golgi-like pozitivita prolaktinu
	Acidofilní tumor z kmenových buněk	Expres prolaktinu, někdy STH, onkocytární změna cytoplasmy
Thyreotropní tumory	Thyreotropní tumor	βTSH, α-podjednotka
<b>Tumory z Tpit<sup>+</sup> linie</b>		
Kortikotropní tumory	Denzně granulovaný kortikotropní tumor	ACTH, difúzní cytoplasmatická pozitivita cytokeratinu 18
	Řídce granulovaný kortikotropní tumor	ACTH, difúzní cytoplasmatická pozitivita cytokeratinu 18
	Tumor z Crookeových buněk	ACTH, Prstenčitá pozitivita cytokeratinu 18
<b>Tumory z SF1<sup>+</sup> linie</b>		
Gonadotropní tumory		βFSH, βLH, α -podjednotka
<b>Tumory bez zjevné diferenciaci (tzv. null cell)</b>		Negativní průkaz hormonů a Pit1, Tpit a SF1
<b>Plurihormonální tumory</b>	Plurihormonální tumory	Různé kombinace hormonů
	Plurihormonální Pit1 <sup>+</sup> tumor	STH, prolaktin, βTSH
<b>Dvojité tumory</b>		Kolize dvou různých PitNETů

Tabulka 4.2 – Incidence jednotlivých patologických subtypů PitNETů (upraveno dle (20, 21))

Druh tumoru	Prevalence
Prolaktinomy	40 - 45 %
Somatotropní tumory	20 %
Kortikotropní tumory	10 – 12 %
Gonadotropní tumory	15 %
Thyreotropní tumory	1 – 2 %
Null-cell tumory (negativní v imunohistochemickém průkazu hormonů)	10 %
→ Z toho SF1 <sup>+</sup> (gonadotropní tumory)	66 %
→ Z toho Tpit <sup>+</sup> (kortikotropní tumory)	27 %
→ Z toho Pit1 <sup>+</sup> tumory	2 %
→ Z toho tumory negativní v průkazu transkripčních faktorů	5 %

Tabulka 4.3 – Incidence jednotlivých patologických subtypů PitNETů u pacientů s akromegalií (převzato dle(15))

Subtyp	Prevalence
Denzně granulované somatotropní tumory	30 – 40 %
Řídce granulované somatotropní tumory	20 – 30 %
Somato-laktotropní tumor	20 – 25 %
Mammosomatotropní tumor	5 – 8 %
Acidofilní tumor z kmenových buněk	0,8 %
Plurihormonální tumory	3 – 6 %
Hyperplázie STH secernujících buněk	0,2 %

#### 4.2.3 Řídce granulované somatotropní tumory (sparsely granulated somatotroph tumors, SGST)

Řídce granulované PitNETy mají cytoplasmu chromofobní a jeví variabilní intenzitu positivity STH. Charakteristickým znakem řídce granulovaných somatotropních PitNETů je přítomnost fibrózních tělísek. Jedná se o globoidní agregáty cytokeratinových filament, obvykle v oblasti hrubého endoplasmatického retikula, které lze identifikovat v histologických řezech. Řídce granulované PitNETy mají agresivnější biologické chování (viz sekce 4.5.4), horší klinickou odpověď na léčbu somatostatinovými analogy a jejich definujícím znakem je přítomnost fibrózních tělísek ve více než 70 % buněk (15, 16, 22, 23). Fibrózní tělíska se v menším množství (<70 %) mohou vyskytnout v některých denzně granulovaných adenomech, pro něž se pak v literatuře uvádí pojem „transicionální“ či PitNETy se smíšeným vzorem exprese cytokeratinů („mixed pattern“)(22, 24). Klinické vlastnosti této skupiny tumorů se však podobají denzně granulovaným PitNETům a nejsou proto klasifikovány zvlášť(22). SGST mohou koexprimovat prolaktin anebo βTSH. Vzhledem ke klinicky a prognosticky významnější roli přítomnosti fibrózních tělísek v porovnání

s koexpresí prolaktinu (23, 25) či poměrně vzácnou koexpresí  $\beta$ TSH (22) však představuje nejspíše racionálnější přístup ke klasifikaci vyčlenění všech tumorů s fibrózními tělísky ve více než 70 % buněk jakožto tumorů řídce granulovaných, bez ohledu na koexpresi prolaktinu či  $\beta$ TSH (viz sekce 4.2.4 a 4.2.5).

#### **4.2.4 Somatotropní tumory s koexpresí prolaktinu**

PitNETy s koexpresí STH a prolaktinu se dle WHO klasifikují buďto jako mamosomatotropní anebo smíšené somato-laktotropní. U mamosomatotropních PitNETů je produkce obou hormonů lokalizována do jedné buňky, zatímco somato-laktotropní PitNETy jsou tvořeny dvěma buněčnými populacemi se separátní produkcí prolaktinu a STH. Jednoznačné odlišení obou skupin je možné na podkladě elektronmikroskopického vyšetření a v současné době nemá hlubší význam(13, 15). Koexprese prolaktinu je v somatotropních tumorech běžná: v jedné studii exprimovalo prolaktin v průměru v 11,5 % buněk PitNETů (u 141 pacientů s akromegálií) zařazených do studie, a to jako v kohortě s fibrózními tělísky, tak v kohortě s perinukleární pozitivitou cytokeratinů. Mezi oběma kohortami nebyl statisticky signifikantní rozdíl v množství buněk exprimujících prolaktin(24). V jiné studii akromegalických pacientů byla koexprese prolaktinu detekována v 48 % (116/242) vyšetřených tumorů, s jednoznačnou převahou PitNETů s perinukleární expresí cytokeratinů (26). V další studii i po vyloučení tumorů s imunohistochemickou pozitivitou prolaktinu ve více než 5 % buněk bylo stále možné identifikovat rozptýlené buňky tvořící prolaktin až v 47 % (49/104) případů(22). Vzhledem k výše uvedenému je zřejmé, že exprese prolaktinu v tumorech představuje kontinuum, přičemž různé studie používají různá kritéria pro subklasifikaci, neboť WHO nedefinuje konkrétní procento prolaktin produkujících buněk nutné pro zařazení do kategorií mamosomatotropního či somato-laktotropního tumoru. Současná doporučení European Pituitary Pathology Group (EPPG) navrhuje pro tyto kategorie cut-off 10 % prolaktin secernujících buněk(16).

#### **4.2.5 Somatotropní tumory s koexpresí $\beta$ TSH**

Koexprese  $\beta$ TSH je u somatotropních PitNETů detekovatelná v menším množství případů: ve výše zmiňovaných studiích byla prokazatelná u 12 % PitNETů(26), 8,5 % PitNETů (22) a v průměru v 0,7 % buněk PitNETů(24). Tyto PitNETy se klasifikují jako plurihormonální. Jak plurihormonální jsou též označována somatotropní PitNETy s produkcí dalšího hormonu jiného než prolaktin(27). Množství buněk exprimujících jiný hormon nutné pro klasifikaci tumoru jakožto plurihormonálního nebylo ve WHO klasifikaci definováno. Obecně se však

soudí, že by se nemělo jednat o ojedinělé buňky, neboť v takovém případě nelze vyloučit, že se jedná o zbytky normální hypofyzární tkáně zavzaté do tumoru(16).

#### **4.2.6 Acidofilní PitNET z kmenových buněk**

Dalším subtypem PitNETu produkujícího STH je acidofilní tumor z kmenových buněk (ATKB, „acidophilic stem cell adenoma“). Jednotka byla k STH produkujícím tumorům řazena v předchozí WHO klasifikaci, v současné WHO byla z níže popsanych důvodů přesunuta ke skupině PitNETů produkujících prolaktin. ATKB produkují primárně prolaktin a většina pacientů jeví známky hyperprolaktinémie, u části pacientů je však přítomna zvýšená hladina růstového hormonu, někdy s asociovanou akromegálií(15, 28). Většina buněk ATKB je imunoreaktivní pro prolaktin a jen menší část buněk produkuje STH. Přítomná jsou rozptýlená fibrózní tělíska. Nádory mají charakteristicky eosinofilní granulární cytoplasmu, místy vakuolizovanou, podmíněnou přítomností zmožených mitochondrií: k diagnóze je obvykle zapotřebí doplnění elektronové mikroskopie(14, 19, 28). ATKB vykazují klinicky agresivní chování.

#### **4.2.7 Plurihormonální Pit1+ PitNET**

Poslední podkategorií somatotropních tumorů je plurihormonální Pit1<sup>+</sup> PitNET (PPPT) hypofýzy známý v dřívějších klasifikacích jako tichý adenom subtyp 3 („silent 3 subtype pituitary adenoma“). Jedná se vzácný tumor, který je obvykle klinicky tichý - bez endokrinní manifestace – a vyznačuje se expresí Pit1. Tumory dále exprimují, obvykle v malém a variabilním množství buněk, hormony typické pro Pit1<sup>+</sup> buněčnou linii (STH, βTSH, prolaktin)(29), transkripční faktor GATA3, který je typický pro thyreotropní linii diferenciace(18), případně hormony jiných buněčných linií(30). Nádor má charakteristický elektronmikroskopický obraz s hyperplastickým Golgiho aparátem a jadernými inkluzemi zvanými sferidia(31, 32), část tumorů má vřetenobuněčnou morfologii(29). V kontrastu se svým názvem byla v opakovaných studiích část případů hormonálně aktivní, včetně pacientů s klinicky manifestní akromegálií(29, 30). Ve většině dostupných studií je tento tumor definována ultrastrukturálně(31, 32). WHO klasifikace v současné době v podstatě neposkytuje přesná kritéria k odlišení PPPT od jiných plurihormonálních PitNETů v kontextu situace, kdy část PPPT je endokrinologicky aktivní. Odlišení jednotky má však klinický význam, neboť tyto tumory se obvykle vyznačují agresivním chováním(12, 16, 29, 31, 32).

### **4.3 Klinické projevy a terapie somatotropních PitNETů**

#### **4.3.1 Přehled klinických projevů somatotropních PitNETů**

Klinické projevy somatotropních PitNETů lze rozdělit do tří skupin(20, 33). První skupina projevů je způsobena vlastní masou tumoru („mass effect“), případně invazí nádoru do okolních struktur. Druhá skupina projevů je vyvolána útlakem tkáně okolní hypofýzy a projevuje se hypopituitarismem. Třetí skupina projevů je podmíněna vlastní syntetickou produkcí adenomu, který může produkovat pouze růstový hormon a navíc někdy též další hormony - nejčastěji prolaktin, méně často TSH. Jiné kombinace vyvolané plurihormonálními adenomy jsou raritní.

#### **4.3.2 Přímé klinické projevy způsobené růstem tumoru**

Mass effect se klinicky projevuje nejčastěji bolestmi hlavy (až u 60 % pacientů)(34). Přítomny mohou být poruchy zorného pole, neboť tumor obvykle utlačuje chiasma opticum – nejčastější bývají výpadky v temporální oblasti a později se může vyvinout bitemporální hemianopsie(34). Obří adenomy mohou vyvolávat epileptické paroxysmy, obstrukční hydrocefalus anebo exoftalmus při invazi oční(34). V případě infiltrace vedlejších nosních dutin os sphenoidale se může vyskytnout likvorhea(35). Nádory se relativně často šíří laterálně do sinus cavernosus, což přispívá k rozvoji bolestí hlavy. Mass efekt je častým projevem u makroadenomů, případně obřích PitNETů. Vzácným projevem je tzv. pituitární apoplexie, kdy dojde ke krvácení do adenomu a k rychlému zvětšení tumoru. Projevem je náhle vzniklá bolest hlavy a porucha zraku, známky nitrolební hypertenze a rozvoj panhypopituitarismu. V některých případech přechází pituitární apoplexie do subarachnoidálního krvácení(36). U somatotropních PitNETů je tato komplikace vzácná(36). Následkem útlaku struktur normální hypofýzy se u části pacientů může rozvinout hypopituitarismus. Hypopituitarismus může být parciální (postižení pouze některých hormonálních os) anebo kompletní (panhypopituitarismus). Rozvoj je obvykle pomalý a počáteční klinické příznaky jsou frustní a nespecifické (20, 37).

#### **4.3.3 Přímé klinické projevy způsobené sekreční aktivitou tumoru**

Hypersekrece STH vede u pacientů před uzávěrem růstových štěrbin k rozvoji gigantismu a u pacientů po uzávěru růstových štěrbin ke vzniku akromegalie(20, 33, 34). Samotný STH stimuluje v periferních tkáních, a především v játrech tvorbu insulin-like growth factor 1 (IGF1), který je spoluzodpovědný za rozvoj klinické symptomatologie(20). U pacientů dochází k růstu akrálního a faciálního skeletu, makroglosii, visceromegálii, kardiomegálii,

kloubním poruchám, periferní neuropatii, myopatii a dalším méně častým klinickým projevům – viz tabulka 4.4 (33, 34). Zvýšená hladina STH/IGF1 vede ke vzniku glukózové intolerance, diabetu, dyslipidémie a arteriální hypertenze. Pacienti mají zvýšené riziko kardiovaskulárních a nádorových onemocnění (20, 33, 34). Sekrece TSH u některých tumorů může vyvolat hyperthyreózu a sekrece prolaktinu může vést k poruchám menstruačního cyklu, sexuální dysfunkci a galaktorhee (20). U části pacientů je přítomna laboratorní elevace hladiny prolaktinu podmíněná nikoliv vlastní sekrecí tumorem, ale útlakem nervově cévní stopky (tzv. stalk effect), neboť normální sekrece prolaktinu je negativně regulována dopaminem přiváděným portální cirkulací (viz sekce 1) a v případě útlaku stopky tento normální inhibiční efekt vymizí (38).

Tabulka 4.4 – Klinické projevy akromegalie a jejich prevalence (převzato z (34))

<b>Klinické projevy akromegalie (seřazeno sestupně podle frekvence výskytu)</b>
Růst akrálních částí
Deformity obličeje
Otok měkkých tkání
Zvýšené pocení
Bolesti hlavy
Erektilní dysfunkce
Arthritida
Únava
Periferní neuropatie a parestézie
Deprese
Syndrom karpálního tunelu
Pokles libida
Myopatie
Dyspnoe
Galaktorea

#### 4.3.4 Laboratorní diagnostika akromegalie

K laboratorní diagnostice akromegalie se používá detekce zvýšené sérové hladiny IGF1 a ztráty supresivního účinku glukózy po orálním glukózovém tolerančním testu (oGTT) na sérovou hladinu STH (33). Hodnoty IGF-1 korelované k věku a hodnoty STH (normální náhodná hodnota <1 µg/l) a míra poklesu hladiny STH po administraci oGTT (normální <0.4 µg/l při použití sensitivních biochemických metodik) se užívají k laboratornímu hodnocení aktivity onemocnění (33, 39, 40). Dále lze v séru detekovat hladiny TSH a prolaktinu. V rámci laboratorního vyšetření je též nutné zhodnotit hladiny ostatních hypofyzárních hormonů k vyloučení případného hypopituitarismu.



### **4.3.5 Význam zobrazovacího vyšetření v diagnóze a terapii somatotropních PitNETů**

#### *4.3.5.1 Obecný význam zobrazovacího vyšetření u nádorů hypofýzy*

Zobrazovací vyšetření slouží k verifikaci přítomnosti tumoru, zhodnocení velikosti a invazivity. Vzhledem k povaze posuzovaných tkání a rozlišovacím schopnostem metodiky se pro účely posouzení hypofyzární patologie používá standardně vyšetření pomocí magnetické resonance (MRI).

#### *4.3.5.2 Hodnocení velikosti somatotropních tumorů*

V souladu s WHO klasifikací diskutovanou v sekci 4.1 se na podkladě MRI vyšetření odlišují mikrotumory (<10 mm v největším průměru), makrotumory (10 – 40 mm v největším průměru) a obří tumory (>40 mm v největším průměru). Měření velikosti lze zpřesnit výpočtem objemu tumoru. Objem může být poměrně přesně odhadnut pomocí počítačových algoritmů hodnotících plochu tumoru ve vícečetných rovinách. Snáze, avšak s menší přesností lze objem odhadnout pomocí rovnice k výpočtu objemu elipsoidu  $\frac{4}{3}\pi \cdot a \cdot b \cdot c$ , kde a, b a c jsou délky tří os tumoru. Zatímco obě metody poskytují obdobné výsledky u malých tumorů, s narůstající velikostí nádoru vykazuje matematická aproximace objemu nižší přesnost ve srovnání s počítačovými metodami stanovení objemu (41).

#### *4.3.5.3 Hodnocení invazivity somatotropních tumorů.*

Invazivita je u tumorů adenohypofýzy definována jako prorůstání nádoru za hranice sella turcica vymezeného dura mater do sinus cavernosus anebo do sinus sphenoidalis.

Suprasellární šíření není považováno za invazi v pravém smyslu slova, neboť jeho přítomnost může pouze odrážet variace v anatomických poměrech v oblasti diaphragma sellae (42).

Incidence invazivních tumorů se v literatuře pohybuje mezi 25–55 % a vzrůstá s velikostí nádoru(42). Přítomnost nádorové invaze snižuje pravděpodobnost kompletní chirurgické resekce a zvyšuje riziko recidivy(1, 40, 43-45). Pro radiologické hodnocení invaze jsou v současné době využívány klasifikace dle Hardyho a Knospa. Hardyho klasifikace hodnotí změny kostěných struktur sella turcica při invazi tumoru(46, 47). Knospova klasifikace pak hodnotí vztah mezi tumorem a strukturami (především a. carotis int.) v sinus cavernosus(44). Bližší popis obou klasifikací je nad rámce této práce a odpovídající informace lze nalézt ve výše citovaných pracích.

Kromě radiologického vyšetření lze v některých případech identifikovat invazi též histologicky, prorůstá-li tumor do sinonazální sliznice anebo mezi kostní struktury(1). Tento

nález je však v histologickém materiálu neobvyklý a spolehlivější je proto radiologické hodnocení invaze.

#### **4.3.6 Terapeutické cíle léčby akromegalie**

Úspěšná terapie akromegalie má za cíl kompletní odstranění či významnou redukci objemu tumoru a následné dosažení biochemické remise onemocnění. V případě objemných tumorů je dalším významným cílem terapie dekomprese zkravého nervu. Terapeutické výsledky zákroku lze monitorovat prostřednictvím vyšetření perimetru, s pomocí zobrazovacích metod, především magnetické resonance (MRI), a především biochemicky. Jako biochemická remise se označuje redukce hladiny IGF1 na úroveň odpovídající normálním hodnotám v daném věku, neboť hladina IGF1 představuje nejspolehlivější ukazatel aktivity onemocnění. Hladina STH  $< 1,0$  mg/l v náhodném odběru představuje další ukazatel kompenzace onemocnění: vzhledem k fyziologickým výkyvům hladiny STH během dne je však vhodnějším ukazatelem kompenzace onemocnění zhodnocení suprese sekrece STH po provedení oGTT. Jako biochemická remise se hodnotí potlačení hladiny STH po administraci oGTT  $< 1,0$  mg/l(40). V závislosti na citlivosti použitých biochemických metod pak novější standardy uvádí hodnotu  $< 0,4$  mg/l(48).

#### **4.3.7 Terapeutické postupy v léčbě akromegalie**

##### *4.3.7.1 Přehled terapeutických postupů v léčbě akromegalie*

V současné době existují pro léčbu akromegalie modalita chirurgické, farmakologické a radioterapeutické. Léčba onemocnění je pak možná buďto pouze jednotlivými metodami, anebo, častěji, jejich kombinací v závislosti na klinickém kontextu.

##### *4.3.7.2 Chirurgická léčba akromegalie*

Při chirurgické léčbě je hlavní prioritou kompletní odstranění tumoru, jež by zabránilo recidivám onemocnění a vedlo k vyléčení pacienta. Hlavním chirurgickým postupem je kompletní odstranění tumoru z transsfenoidálního přístupu do oblasti sella turcica, buďto pomocí mikrochirurgické anebo endoskopické metodiky. Obě chirurgické metody jsou v případě mikrotumorů srovnatelné, v případě makrotumorů se jako vhodnější postup ukazuje endoskopická technika(49). Úspěšnost chirurgického zákroku se odvíjí od invazivity tumoru a jeho velikosti: v případě lézí omezených na sella turcica je biochemické remise onemocnění dosaženo až u 75 % pacientů bez ohledu na velikost tumoru. U invazivních tumorů je situace odlišná: po první operaci dosáhne remise pouze 44,5 % pacientů se supraselárně se propagujícím tumorem, 41,5 % pacientů paraselární a-nebo sfenoidální propagací (invazí) a

33 % nádorů s útlakem optického nervu(40). Obdobně klesá pravděpodobnost dosažení remise v závislosti na velikosti tumoru, kdy u mikrotumorů se udává úspěšná chirurgická léčba až v 95 % případů, u nádorů o průměru 1-2 cm je to pouze 40-68 % a v případě tumorů větších než 2 cm klesá úspěšnost chirurgického zákroku hodnocená dosažením biochemické remise k 20 %(43). Chirurgická léčba je indikována na prvním místě vždy v případě útlaku zrakového nervu a dále v případě, kdy vzhledem k velikosti a invazivitě tumoru lze očekávat remisi po operačním zákroku(40): v České Republice je chirurgická léčba indikována na prvním místě i v případě nádorů, u nichž nelze očekávat kompletní resekci, za účelem snížení objemu („debulking“) před další terapií(43).

#### *4.3.7.3 Farmakologická léčba akromegalie*

Ve farmakologické léčbě akromegalie se uplatňují tři skupiny léčivých přípravků: dopaminoví agonisté (DA), somatostatinová analoga (SSA) a antagonist receptoru pro růstový hormon (Pegvisomant)(40, 43). Používání dopaminoví agonisté, jejich klinické účinky a efektivita jsou diskutovány v sekci 4.7. Používaná somatostatinová analoga, jejich klinické účinky a efektivita jsou diskutovány v sekci 4.6. V České republice se z dopaminových agonistů používá v podstatě pouze cabergolin, ze somatostatinových analog se používají pouze oktreotid a lanreotid v dlouhoúčinkujících formách. Přestože je pasireotid na českém trhu dostupný, v současné době se vzhledem k vysoké ceně a vedlejším účinkům v podstatě nepoužívá(43). Pegvisomant je antagonist receptoru pro růstový hormon (GHR) se strukturou analogickou normálnímu růstovému hormonu, jenž je ve farmakologicky aktivní formě vázán na polyetylenovou molekulu (PEG forma) za účelem prodloužení plasmatického poločasu. Terapie pegvisomantem je ve srovnání s SSA a DA velmi nákladná. Výše uváděné farmakologické přípravky lze aplikovat samostatně anebo v kombinaci, přičemž klinická rozhodovací schémata podávání těchto přípravků v jednotlivých situacích jsou nad rámec této práce a lze se s nimi seznámit např. v práci Colao et al(40). V našem kontextu je nutné uvést pouze několik poznámek: i přes existenci zahraničních studií se v České Republice SSA obvykle nepoužívají v neoadjuvantní indikaci k preoperační redukci velikosti tumoru. Jako první se z farmakologických přípravků podává obvykle cabergolin a v případě klinické resistance se následně přidává některé z SSA první generace (oktreotid anebo lanreotid). Pegvisomant pak představuje třetí linii farmakologické léčby u pacientů, kteří nedosáhli remise po aplikaci DA a SSA(43).

#### *4.3.7.4 Radioterapie u akromegalie*

Pro léčbu akromegalie se využívá stereotaktická radioterapie, obvykle pomocí Leksellova gamanože. Radioterapie je obvykle indikována v případě selhání chirurgické a farmakologické terapie(40), nicméně v České Republice je na některých pracovištích indikována již v případě pooperačního residua tumoru anebo u pacientů s kontraindikací chirurgického výkonu(50). Radioterapii lze doplnit medikamentózní léčbou diskutovanou dříve v této sekci (43).

#### **4.4. Genetický podklad somatotropních PitNETů**

##### **4.4.1 Obecné poznámky ke genetice somatotropních PitNETů**

Genetický podklad somatotropních tumorů hypofýzy byl opakovaně studován, a to jak ve sporadických tumorech, tak v nádorech u pacientů s familiárním onemocněním. Na podkladě těchto analýz bylo možné identifikovat genetické změny v zárodečné linii vedoucí ke vzniku somatotropních tumorů anebo PitNETů hypofýzy obecně. Studium sporadických tumorů včetně použití moderních molekulárně genetických metod nepřineslo i přes velká očekávání žádné nové informace, jež by významněji přispěly k porozumění patogenezi a dynamice onemocnění.

##### **4.4.2 Genetické změny v zárodečné linii vedoucí ke vzniku somatotropních PitNETů**

Na podkladě studia pacientů z rodin s familiálními nádory adenohypofýzy bylo identifikováno několik genetických syndromů a popsáno několik genetických změn zodpovědných za patogenezi těchto tumorů. Mezi nejčastější genetické onemocnění asociované se vznikem somatotropních tumorů patří syndrom izolovaných familiálních adenomů hypofýzy (familial isolated pituitary adenomas syndrome, FIPA). Méně častý je X-vázaný akrogigantismus (X-linked acrogigantism, XLAG), a dále výskyt somatotropních PitNETů v kontextu syndromů vícečetných endokrinních neoplázií typ 1 a 4 (multiple endocrine neoplasia, MEN) a syndromů familiálních paragangliomů (mutace v proteinech komplexu sukcinát dehydrogenázy). Mutace genů zodpovědných za vznik familiálních případů nebyly ve sporadických tumorech identifikovány (51-53).

###### *4.4.2.1 Syndrom izolovaných familiálních adenomů hypofýzy (FIPA)*

FIPA syndrom je definován přítomností minimálně dvou PitNETů u pacientů, kteří jsou v blízkém rodinném vztahu (obvykle příbuzní 1. stupně). Nádory u jednotlivých členů rodiny mohou být stejného subtypu (tzv. homogenní FIPA) anebo různého subtypu (tzv. heterogenní FIPA). Nejčastěji se vyskytujícími tumory jsou nádory z Pit1 linie, převážně prolaktinomy a na druhém místě pak somatotropní PitNETy(51, 54). Pacienti bývají v průměru o 4 roky

mladší ve srovnání se sporadickými nádory, po patologické stránce se nádory vzniklé v kontextu FIPA nijak neliší od sporadických(54). V 15-20 % případů byla jako podklad onemocnění identifikována mutace v genu *AIP* (aryl-hydrocarbon receptor interacting protein), ve zbytku případů je přesný genetický mechanismus neznámý(51, 54). U rodin s mutací *AIP* tvoří somatotropní tumory 86 % všech PitNETů (51). Mutace *AIP* je autosomálně dominantní, se ztrátou heterozygosity nemutované alely jakožto druhým krokem v patogenezi tumorů; penetrance se pohybuje mezi 20-23 %. Téměř 80 % pacientů je mladší 30 let a téměř všechny nádory se prezentují do 40 roku věku(55). Nádory bývají častěji makroadenomy s extraselární invazí a charakteristicky nereagují na léčbu oktreotidem a lanreotidem (viz 4.6.9)(51). Prakticky všechny tumory s mutací genu *AIP* jsou sdružené s mutací v zárodečné linii: ve dvou kohortách čítajících celkem 575 pacientů s klinicky sporadickými PitNETy byla mutace identifikována celkem v 33 případech, přičemž ve všech se jednalo o zárodečnou mutaci (55, 56). De novo mutace byla popsána pouze v jediném případě, ve všech zbývajících odráží výskyt mutace *AIP* u zdánlivě sporadických tumorů pouze nízkou penetranci onemocnění(51).

#### **4.4.3 Genetické změny somatického charakteru v somatotropních PitNETech**

##### *4.4.3.1 Obecný přehled změn somatického genomu v somatotropních PitNETech*

Opakované genetické studie v minulosti zaznamenaly pouze jediný gen, jehož mutace byly asociovány se somatotropními tumory. Jednalo se o gen *GNAS1*. Problematika mutace *GNAS1* a jejího vlivu na tumorigenezi a fenotyp somatotropních PitNETů je blíže diskutována v sekci 4.4.3.2. Jedna studie identifikovala dále mutaci v genu *GHR* s významným dopadem na fenotyp tumorů; tento nález nebyl v dalších studiích potvrzen a je diskutován separátně v sekci 4.4.3.3. V recentní době se o genetickou charakterizaci somatotropních PitNETů pokusily dvě studie využívající moderní molekulárně genetické metody. Série 12 pacientů studovala tumory pomocí sekvenace celého genomu (whole genome sequencing) metodou NGS (next-generation sequencing). Jeden z pacientů vykazoval mutaci *AIP*, tři další pacienti *GNAS1* mutaci a ve zbytku tumorů nebyly identifikovány žádné opakující se mutace v kódujících genových sekvencích. V tumorech bylo dále identifikováno celkem 21 genových strukturálních změn chromozomů, které však též neměly rekurentní charakter(52). Druhá studie analyzovala pomocí sekvenace celého exomu (whole exome sequencing, WES) celkem 36 somatotropních PitNETů: celkem bylo identifikováno 132 mutací, přičemž v 41 případech tyto nejspíše neměly funkční konsekvence a přitomno bylo též 5 tumorů bez identifikovatelných exomových mutací. Mutační profil nijak nekoreloval s klinickými

parametry (věk, pohlaví, hladina IGF1 a velikost tumoru). Jedinou identifikovanou opakující se mutací byla aktivační mutace v *GNASI* (13/36 případů)(53).

#### 4.4.3.2 Význam mutace genu *GNASI* v patogenezi a klinickopatologickém fenotypu somatotropních PitNETů

Mutace v genu *GNASI* je nejčastěji detekovanou a v podstatě jedinou opakovaně identifikovanou mutací v somatotropních PitNETech. Gen *GNASI* kóduje α-podjednotku trimerického G-proteinu ( $G_{\alpha s}$ ), zodpovědnou za signalizační funkci G-proteinového komplexu asociovaného s receptorem pro somatotropin uvolňující hormon (GHRH) (57). Mutace vede ke konstitutivní aktivaci  $G_{\alpha s}$ ; takto mutovaný protein bývá v literatuře označován jako onkogen *gsp* (57). *Gsp* je přítomen v 30-40 % somatotropních tumorů(58). Mezi charakteristické vlastnosti nádorů s *gsp* se v literatuře opakovaně uvádí denzně granulovaný subtyp, vyšší hladina produkovaného STH, menší velikost a dobrá léčebná odpověď na SSA(57, 59) avšak univerzální platnost těchto nálezů nebyla v dalších studiích potvrzena (24, 59-62) Význam přítomnosti mutace *GNASI* ve vztahu ke klinickopatologickým vlastnostem tumorů je tedy v současnosti nejednoznačný: tato problematika je zevrubněji diskutována např. v úvodu studie od Larkin et al. (59) a dle názoru autora je její další hlubší rozbor nad rámec této práce.

#### 4.4.3.3 Význam mutace *GHR* v patogenezi somatotropních PitNETů

Jedna ze studií identifikovala v 43 % (6/14) SGST, nikoliv však v 12 DGST, heterozygotní mutaci *GHR* genu kódujícího receptor růstového hormonu. Tento nález vedl autory k hypotéze, že SGST fenotyp může být způsoben narušenou autoregulační signalizací STH prostřednictvím mutované formy *GHR* a byl podpořen experimentem na buněčných kulturách odvozených z DGST, kdy po podání pegvisomantu vedla došlo v buňkách k utvoření fibrózních tělísek charakteristických pro SGST fenotyp(60). Mutace v *GHR* však nebyla zaznamenána v žádné další provedené studii (52, 53, 59) a nález nepodporují ani výsledky in vivo studií u pacientů léčených pegvisomantem (63).

#### 4.4.4 Závěr

Somatotropní tumory mohou vznikat na podkladě zárodečných mutací (nejčastěji genu *AIP*) anebo jsou asociovány s rekurentní somatickou mutací genu *GNASI*. Ve sporadických tumorech představuje *GNASI* v podstatě jediný mutovaný gen opakovaně identifikovaný v nezávislých studiích. Mutace v somatických sekvencích genů tedy nejspíše nehrají výraznější roli v patogenezi somatotropních PitNETů. Na vzniku nádorů se tedy nejspíše ve

větší míře podílí epigenetické mechanismy regulace, a též chromozomální alterace, především v podobě aneuploidií při ztrátách či zisku celých chromozomů.

#### **4.5 Prognostické faktory somatotropních PitNETů**

##### **4.5.1 Obecný přehled prognostických faktorů ovlivňujících biologické chování somatotropních PitNETů**

Hlavním terapeutickým cílem je u akromegalie kompletní odstranění tumoru s následným dosažením biochemické remise onemocnění (viz sekce 4.3.6). V případě selhání léčby není buďto biochemické remise dosaženo anebo po přechodné remisi dochází k rekurenci onemocnění. Na řadu pak přichází další linie léčby (farmakoterapie a radioterapie), včetně potenciální reoperace. Vzhledem k malému množství pacientů a relativně individualizovanému přístupu k léčbě (dávkování SSA, délka aplikace atp.) je hodnocení léčebné odpovědi u pacientů s akromegalií limitováno častým heterogenním charakterem souborů, které omezuje systematictější studium problematiky(64, 65). V této sekci budou diskutovány parametry, jež mohou ovlivňovat jednak riziko rekurence onemocnění a dále limitují kompletní chirurgické odstranění tumoru (čímž opět implikují rekurenci onemocnění). Faktory ovlivňující odpověď na farmakologickou léčbu SSA a DA (a tedy v podstatě prognózu při farmakoterapii) jsou diskutovány v sekcích 4.6, respektive 4.7. Hlavními klinickými faktory dávanými do souvislosti s prognózou somatotropních PitNETů jsou velikost tumoru, invaze tumoru do okolních struktur, hladiny STH a IGF1. Před samotným rozбором jednotlivých faktorů je nutné zmínit, že část diskutovaných parametrů spolu může navzájem přímo souviset (např. velikost tumoru a invazivita ovlivňující resekabilitu) a hodnocení jejich nezávislého významu je tedy omezené.

##### **4.5.2 Klinické parametry ovlivňující prognózu somatotropních nádorů**

Mezi nejčastěji uváděné a studované parametry s potenciálním prognostickým významem patří velikost, invazivita tumoru a dále hladiny STH a IGF1. Nejvýznamnějším empirickým prognostickým parametrem je velikost tumoru: s rostoucí velikostí nádoru roste frekvence invaze okolních struktur a snižuje se pravděpodobnost radikálního odstranění chirurgickou procedurou(45, 66, 67). Zatímco u mikrotumorů bylo v největší dosud publikované studii dosaženo remise u 75 % pacientů (142 případů), u makrotumorů to bylo pouze v 50 % (364 případů)(45), v další studii se jednalo o 100 % dosažené remise u mikrotumorů (celkem 14 případů) ve srovnání s 60% úspěšností u makrotumorů (celkem 46 případů)(67). Jiné obdobné studie shrnuté v pracích Jane et al. a Kim et al. tento závěr dále podporují(66, 67). S velikostí souvisí problematika invazivity jakožto prognostického parametru: zatímco naprostá většina

mikrotumorů je omezena na oblast sella turcica, většina makrotumorů prorůstá vzhledem k anatomickým poměrům do okolních struktur. Ve výše citované studii z celkem 364 makrotumorů (včetně 10 obřích tumorů) bylo pouhých 30 % (105 tumorů) lokalizováno v oblasti sella turcica(45), ve srovnání se 135/142 mikrotumorů. Zatímco u intrasellárně lokalizovaných makrotumorů došlo k pooperační remisi v celkem 75 % (78/105 případů), u makrotumorů invadujících sinus cavernosus to bylo pouze 42 % (59/142 případů). Obdobná byla frekvence remise u případů se suprasellárním šířením (42 %, 45/107 případů)(45). Invaze sinus cavernosus byla opakovaně vyhodnocena v multivariační analýze jako významný prediktor pro nedosažení remise též v dalších studiích (66, 67). Dalšími klinickými parametry, jejichž prognostický význam byl studován, jsou hladina IGF1 (stanovená v násobcích normální referenční hladiny) a hladina STH. Hladiny STH a IGF1 představovaly prognostický ukazatel v multivariační analýze některých studií (66, 67) a hladina STH dále negativně korelovala s pravděpodobností dosažení remise a byla signifikantně vyšší u makrotumorů ve srovnání s mikrotumory(45). Souvztažnost hladiny STH, IGF1 a velikosti tumoru však není zcela lineární a ovlivňuje ji patologický subtyp tumoru, neboť skupina SGST se od ostatních tumorů s produkcí STH odlišuje nižší sekrecí STH a nižšími hladinami IGF1 na jednotku objemu tumoru (24, 62, 68, 69). Neboť SGST bývají obecně větší ve srovnání s ostatními somatotrofními tumory (22, 24) (viz sekce 4.5.3), v části studií se pak sérová hladina STH mezi jednotlivými patologickými podskupinami tumorů nemusí signifikantně lišit (59). Z výše uvedených důvodů je tedy nezávislý prognostický význam hladin STH a IGF1 omezený.

#### **4.5.3 Patologické parametry ovlivňující prognózu somatotrofních nádorů**

##### *4.5.3.1 Obecný přehled patologických faktorů ovlivňujících prognózu somatotrofních PitNETů*

Prognóza PitNETů je na podkladě patologického vyšetření obtížně stanovitelná, což jen podtrhuje klinickobiologickou analogii těchto nádorů s neuroendokrinními tumory jiných orgánů. Mezi nejčastěji studované a nejlépe charakterizované prognostické parametry patří index Ki67, exprese p53 a mitotická aktivita. Ačkoliv byl jejich význam opakovaně a rozsáhle studován, poskytly studie často protichůdné a obtížně reprodukovatelné údaje o jejich nezávislém prognostickém významu(70). Některé vybrané studie týkající se tématu budou pro ilustraci citovány dále v této sekci. Kombinace těchto parametrů byla též součástí definice tzv. atypického adenomu ve WHO klasifikaci PitNETů z roku 2004(71) a spolu s radiologickými vlastnostmi jsou tyto parametry podkladem klasifikačního schématu dle Trouillas (1), jež je v současné době doporučováno pro rutinní diagnostiku PitNETů(16). Obě schémata jsou blíže



diskutována v sekci 4.5.3.6. Kromě těchto tří parametrů má prognostický význam patologická subtypizace tumorů, kdy současná WHO klasifikace jako tumory s agresivním chováním explicitně uvádí SGST a plurihormonální Pit1<sup>+</sup> tumory(3) – souvislost histologického subtypu a prognózy je blíže diskutována v sekci 4.5.3.

#### *4.5.3.2 Prognostický význam mitotické aktivity v PitNETech*

Mitotická aktivita je v tumorech různých orgánů obecně považována za negativní prognostický faktor, neboť její přítomnost odráží přítomnost aktivně proliferujících buněk. Mitotická aktivita představuje jedno z kritérií pro grading neuroendokrinních tumorů v dalších lokalitách(72). Mitotická aktivita je obvykle hodnocena jako počet mitóz v deseti zorných polích velkého zvětšení (high power field, HPF). HPF je definováno jako plocha pozorovatelná v mikroskopu při 400násobném zvětšení, nicméně v závislosti na fyzikálních vlastnostech optické soustavy se reálná velikost plochy může lišit podle použitého objektivu a okuláru. Tato odlišnost je všeobecně akceptována např. v gradingovém schématu Bloom-Richardsona u karcinomu prsu, nicméně ve studiích zabývajících se mitotickou aktivitou v PitNETech není zohledňována (1, 3, 25, 73). Příčinou je nejspíše skutečnost, že mitotická aktivita je v PitNETech obvykle velmi nízká (3, 70) a lze tedy předpokládat, že rozdíly v hodnocené ploše mezi jednotlivými optickými soustavami by pravděpodobně nevedly k výraznějším rozdílům stanoveného mitotického indexu. Přítomnost mitóz ve studii zahrnující 60 PitNETů různých subtypů (54 lokalizovaných tumorů a 6 karcinomů) korelovala signifikantně s invazivitou a s metastatickým chováním nádoru: z 60 nádorů však byla mitotická aktivita identifikována pouze v 11 tumorech (pouze karcinomy a invazivní tumory) a na podkladě studie nebylo možné určit prognosticky významný cut-off mitotického indexu(74). Ve studii zahrnující 410 PitNETů různých subtypů byla průměrná mitotická aktivita pro skupinu pacientů bez známek onemocnění na konci klinického follow-up (medián 11,14 let) 1,39 mitózy/10 HPF ve srovnání s 2,81 mitózy/10HPF ve skupině pacientů se známkami onemocnění na konci follow-up. V obou skupinách se vyskytly případy bez identifikovatelné mitotické aktivity. Neboť studie analyzovala význam souvislosti prognózy a kombinace přítomnosti dalších faktorů (invaze, Ki67 a p53), nebyla samostatná prognostická hodnota mitotické aktivity blíže analyzována (1). V somatotropních tumorech byla mitotická aktivita studována v souboru 101 pacientů, kde zvýšená mitotická aktivita naopak nevykazovala statisticky signifikantní asociaci s invazivitou, dosaženou remisí anebo hladinami IGF1(25). Mitotická aktivita je tedy obecně považována za prognosticky významný faktor, ačkoliv jeho jednoznačná výpovědní hodnota nebyla v části studií potvrzena. Jako

nejčastější prognosticky významný cut-off je obvykle uváděna hodnota  $> 2$  mitóz/10 HPF(1, 73).

#### *4.5.3.3 Prognostický význam imunohistochemicky detekované exprese p53 v PitNETech*

Expres p53 detekovaná imunohistochemií je považována za negativní prognostický faktor. Expres p53 v PitNETech nemá téměř nikdy charakter mutačního typu exprese známého z některých maligních nádorů (mutace TP53 jsou v PitNETech v podstatě raritní, viz sekce 4.4) a omezuje se na kolísavou pozitivitu variabilního množství nádorových buněk (1, 73, 75, 76). Vzhledem k tomu je vzájemné porovnání jednotlivých studií obtížné, neboť na intenzitě výsledné imunohistochemické reakce se může významně podílet nastavení imunohistochemické metodiky v laboratoři. Ve většině studií je hodnoceno percentuální zastoupení pozitivních buněk (73, 75-77), hodnoceno bylo též množství pozitivních buněk v 10 HPF (1). Jako pozitivní jsou pro účely většiny studií obvykle hodnocena pouze jádra se silnou pozitivitou(1, 73, 75). V jedné ze studií byla expres p53 přítomná ve všech případech karcinomů hypofýzy (7/77 případů), v 15,2 % (5/33 případů) invazivních tumorů a v žádném z neinvazivních tumorů. Průměrné množství pozitivních buněk byla 2 % a množství buněk se signifikantně nelišilo mezi karcinomy a invazivními tumory. Index Ki67 byl signifikantně vyšší ve skupině p53 pozitivních tumorů(75). V jiné studii expres p53 naopak nekorespondovala s progresí tumoru(76). Ve studii zahrnující 410 různých subtypů PitNETů byla pozitivita p53 přítomná v 20 % tumorů u pacientů bez známek onemocnění na konci follow-up a ve 40 % tumorů u pacientů s onemocněním. Neboť studie analyzovala význam souvislosti prognózy a kombinace přítomnosti dalších faktorů (invaze, Ki67 a mitotická aktivita), nebyla samostatná prognostická hodnota přítomnosti p53 blíže diskutována. Minimálně 38 % pacientů se známkami onemocnění na konci follow-up však nevykazovalo pozitivitu p53(1). Ve studii zahrnující celkem 47 pacientů s akromegálií byla expres p53 signifikantně vyšší ve skupině pacientů s invazí sinus cavernosus, suprasellárním šířením a u pacientů s radiologickou rekurencí, nebyla však přítomná statisticky signifikantní souvislost s biochemickou rekurencí a přítomností pooperačního nádorového residua(77). Další studie analyzující 101 pacientů s akromegálií naopak nenalezla statisticky významnou souvislost mezi expresí p53 a klinickými parametry tumorů včetně velikosti, invazivity a rekurence(25). Vzhledem k nejednoznačné korelaci klinických ukazatelů s expresí p53 a naopak, častému vztahu mezi expresí p53 a indexem Ki67 zpochybňuje v současnosti platná WHO klasifikace i některé další práce p53 jako nezávislý prognostický faktor(3, 16).

#### *4.5.3.4 Prognostický význam imunohistochemicky detekované exprese Ki67 v PitNETech*

Ki67 je jaderný protein exprimovaný buňkami během buněčného cyklu, nikoliv však v G<sub>0</sub> fázi. Z těchto důvodů je průkaz Ki67 v buňkách považován za ukazatel proliferující frakce nádorů(78). Frakce Ki67 pozitivních buněk hodnocená minimálně na 500 buňkách v hot-spotech představuje gradingové kritérium pro neuroendokrinní tumory zažívací trubice(3). Obdobný postup – tedy zhodnocení nejméně 500–1000 buněk v hot-spotu a následné stanovení podílu Ki67 pozitivních buněk k celkovému množství spočítaných buněk - je doporučován též pro hodnocení Ki67 v PitNETech (16). Jednotlivé dostupné studie zabývající se indexem Ki67 se mohou odlišovat právě množstvím a metodikou počítání Ki67 pozitivních buněk. Množství imunoreaktivních buněk může být též ovlivněno použitým klonem protilátky a též tkáňovým fixativem(70). Prognostický význam exprese Ki67 byl v buňkách PitNETů extenzivně studován a detailní analýza všech dostupných zdrojů je nad rámec tohoto pojednání. Následující přehled má tedy za úkol na vybraných reprezentativních studiích ilustrovat nejednoznačnou povahu celé problematiky Ki67 jakožto prognostického faktoru pro klinické a radiologické parametry u pacientů s akromegalií. V sérii zahrnující celkem 60 PitNETů různých subtypů (54 lokalizovaných tumorů a 6 karcinomů) se skupina karcinomů, invazivních PitNETů a neinvazivních PitNETů signifikantně lišila ve výši Ki67 indexu; ten byl v průměru nejvyšší u karcinomů a v průměru nejnižší u neinvazivních tumorů. Ki67 však nemělo vliv na velikost tumoru (74). Ve studii zahrnující 410 různých subtypů PitNETů byla průměrná hodnota Ki67 ve skupině pacientů bez známek onemocnění po skončení follow-up 0,68 % ve srovnání se skupinou pacientů se známkami onemocnění, kde průměrná hodnota Ki67 dosahovala 3,6 %(1). Ve studii zahrnující 55 PitNETů různých subtypů korespondoval vyšší index Ki67 signifikantně s progresí tumoru, naopak nebyl přítomen signifikantní vztah mezi Ki67 a velikostí nádoru anebo invazí sinus cavernosus. Ve studii 101 somatotropních PitNETů exprese Ki67 nekořespondovala s hladinami IGF1, invazí sinus cavernosus, velikostí tumorů ani s dosaženou remisí onemocnění(25). Protichůdné výsledky pak poskytla studie 47 pacientů s akromegalií, kde index Ki67 byl signifikantně vyšší u pacientů s invazí sinus cavernosus a suprasellárním šířením, a dále u pacientů s residuem po operačním zákroku a s biochemickou rekurencí onemocnění. Statistický rozdíl nebyl naopak pozorován u pacientů s radiologickou rekurencí onemocnění(77). Studie analyzující 68 somatotropních PitNETů prokázala statisticky signifikantní rozdíl v průměrných hodnotách Ki67 mezi skupinou pacientů v remisi onemocnění a pacienty, kteří klinické remise po léčbě nedosáhli. Tumory s invazí sinus cavernosus měli též signifikantně vyšší Ki67. Index Ki67 se naopak nelišil s ohledem na hladinu IGF1 a velikost tumoru(79). Ve studii 338 akromegaliků rozdělených shlukovou analýzou do 3 klinickoprognotických skupin bylo Ki67 u pacientů v klinicky

nejagresivnější skupině signifikantně vyšší ve srovnání se skupinou vykazující nejméně agresivní klinický průběh, design práce však neumožňoval bližší hodnocení vztahu Ki67 a dalších klinickopatologických parametrů (23). Jako cut-off hodnotu Ki67 spojenou s prognosticky nepříznivým chováním uvádí WHO 3 % (3) a tato hodnota bývá nejčastěji používána i v dalších studiích. Jiná práce zabývající se analýzou prognostických ukazatelů PitNETů ve velkém a dobře definovaném souboru 308 pacientů pomocí analýzy křivky ROC (receiver operating characteristics) naopak dospěla k hodnotě 4 %, tento závěr však nebyl v další literatuře nijak zásadně reflektován (73). Výše citované práce tedy ilustrují nejednoznačný prognostický význam Ki67 ve vztahu k jednotlivým klinickoradiologickým parametrům onemocnění.

#### *4.5.3.5 Prognostický význam histologického subtypu nádoru*

Principy histologické klasifikace somatotropních PitNETů dle současně platné WHO klasifikace jsou zevrubně diskutovány v sekci 4.2 této práce. Jako klinicky agresivní subtyp somatotropních tumorů uvádí klasifikace explicitně skupinu SGST a dále plurihormonální Pit1<sup>+</sup> tumory. Za další potenciálně agresivní nádory z Pit1<sup>+</sup> linie se považuje acidofilní tumor z kmenových buněk a též klinicky tiché somatotropní tumory (80). Vzhledem k tomu, že klinickým kritériem pro zařazení do experimentální části této práce byla přítomnost akromegalie, nebude problematika klinicky tichých somatotropních tumorů ani plurihormonálních Pit1<sup>+</sup> tumorů hlouběji diskutována, a to i přesto, že vzácné případy těchto vzácných tumorů mohou hormonální produkci STH, obvykle nízkého stupně, vykazovat (29). V následující části bude shrnuta několik reprezentativních prací zabývajících se vztahem SGST subtypu a klinickými parametry nádorů. SGST jsou v současné době definovány jako tumory s fibrózními tělisky ve více než 70 % buněk. Studie, která tento cut-off v podstatě definovala, prokázala na kohortě 104 pacientů, že SGST se ve srovnání s ostatními somatotropními PitNETy signifikantně častěji vyskytují u mladších pacientů, bývají častěji makrotumory a bývají častěji invazivní (v klasifikacích Hardyho i Knospa) (22). Totožné byly též výsledky dalších několika studií stran velikosti tumorů (celkem 465 pacientů) (26, 59, 81, 82), invazivity, věku pacientů a indexu Ki67, jenž byl ve skupině SGST též vyšší (celkem 294 pacientů) (26, 59). Ve studii 338 akromegaliků rozdělených shlukovou analýzou do 3 klinickoprognotických skupin patřily všechny tumory v klinicky nejagresivnější skupině do kategorie SGST; tyto tumory též vykazovaly signifikantně vyšší index Ki67 ve srovnání s dalšími skupinami. SGST nebyly zastoupeny ve skupině s nejpříznivějším klinickým průběhem, tvořily však 51 % nádorů ve skupině s intermediární prognózou (23). Jednoznačný

prognosticky negativní význam SGST subtypu však nebyl prokázán ve všech studiích: v práci analyzující 141 pacientů, byly SGST signifikantně větší, nelišily se však signifikantně po stránce invazivity, věku pacientů anebo úspěšností chirurgické léčby(24). V jiné studii (celkem 101 pacientů) se SGST od ostatních somatotropních tumorů lišily pouze nižším věkem pacientů, ale nikoliv velikostí, invazivitou, mitotickou aktivitou, indexem p53 a Ki67(25). Příčina těchto odlišností může být podmíněna výskytem neobvykle vysokého podílu makroadenomů v obou studiích (85 % případů v (24) a 90 % v (25)) ve srovnání s jinými pracemi (66 % v (22), 75 % v (26), 61 % v (59) a 75% v (82)). V práci Sarkar et al.(25) se navíc vyskytuje neobvykle vysoký podíl SGST v souboru tumorů (v podstatě 3:1), který neodpovídá normální frekvenci výskytu jednotlivých subtypů somatotropních tumorů (SGST představují v průměru cca 20-33 % v jiných studiích(15)). Tyto údaje svědčí o selekční bias, jež může být podmíněna jednak celkovou úrovní zdravotní péče v dané zemi (Indie - (25)) anebo specializovaným zaměřením centra na větší, a chirurgicky tedy obtížněji odstranitelné nádory.

Kromě výše diskutovaných klinických parametrů se SGST od ostatních somatotropních tumorů odlišují též nižší expresí somatostatinových receptorů (především SSTR2A, viz sekce 4.6), jež pravděpodobně podmiňuje vyšší resistenci na léčbu SSA(23, 62, 82), a expresí E-cadherinu (viz sekce 4.8), který je též považován za prognostický faktor somatotropních tumorů. Závěrem lze tedy říct, že SGST představují fenotypově distinktivní skupinu tumorů s nepříznivými prognostickými vlastnostmi, přičemž po genotypické ani patogenetické stránce nebyl tento rozdíl dosud plně dosud objasněn (viz např. sekce 4.4).

#### *4.5.3.6 Prognostická schémata WHO a Trouillas*

Vzhledem ke klinické potřebě prognostického rozčlenění tumorů a narůstajícím znalostem o odlišnostech mezi karcinomy hypofýzy, invazivními tumory a neinvazivními tumory navrhla WHO v klasifikaci nádorů endokrinních orgánů z roku 2004 jednotku atypického adenomu hypofýzy. Atypický adenom byl definován jako nádor se zvýšenou mitotickou aktivitou, indexem Ki67 > 3 % a rozsáhlou imunohistochemickou pozitivitou p53 (3). Takto formulovaná definice neobsahovala definované cut-offs pro mitotickou aktivitu, hodnocení p53 ani blíže neobjasňovala vztah navržených prognostických veličin. Z těchto důvodů se jednotka atypického adenomu stala v podstatě nereprodukovatelnou, kdy incidence atypických adenomů v různých studiích oscilovala mezi 2,5 % - 15 % případů; s tím se váže též nízká prognostická výpovědní hodnota takto definované jednotky(70). Z těchto důvodů nakonec stávající WHO klasifikace jednotku atypického adenomu v roce 2017 zrušila, trvá

nicméně doporučení uvést ve výsledkovém protokolu histologického vyšetření hodnoty Ki67 a mitotickou aktivitu, případně též expresi p53. Klasifikace dále zmiňuje prognostické schéma publikované Jacqueline Trouillas v roce 2013 a toto schéma je též doporučeno EPPG k rutinnímu použití při histologickém vyšetření PitNETů (3, 16). Gradingové schéma Jacqueline Trouillas bylo validováno na retrospektivní kohortě 410 pacientů s různými histologickými subtypy PitNETů (z toho celkem 111 somatotropních tumorů) a s mediánem klinického follow-up 8 let; studie porovnávala pacienty se známkami onemocnění a pacienty bez onemocnění na konci follow-up (case-control design) (1). Vlastní klasifikační schéma je popsáno v tabulce 4.4 a zohledňuje dva parametry: invazivitu nádoru definovanou invazí sinus sphenoidalis anebo sinus cavernosus (na podkladě zobrazovacích metod) a proliferační aktivitu definovanou přesně stanovenou kombinací parametrů Ki67, p53 a mitotické aktivity. Takto definovaný gradingový systém měl nezávislou, statisticky signifikantní výpovědní hodnotu bez ohledu na histologický subtyp tumoru. Odds ratio (OR) pro všechny proliferující tumory představovalo 2,89. Oproti grade 1A u somatotropních tumorů tedy představovalo OR u grade 1B 2,89. U grade 2A 6,59 a u grade 2B 19,04. Zajímavou skutečností je, že v tomto modelu nebyla prokázána statisticky signifikantní interakce mezi invazivitou nádoru a proliferací ani histologickým subtypem nádoru a proliferací(1). Studie hodnotila různé druhy PitNETů a další detailnější subtypizace skupiny somatotropních tumorů zahrnutých do analýzy tedy nebyla provedena.

Tabulka 4.5 – Prognostický grading tumorů hypofýzy dle Trouillas et al. (1)

<b>Invazivita:</b> definována jako invaze do sinus sphenoidalis anebo sinus cavernosus dle zobrazovacích metod (Hardy a Knosp 3-4) anebo histologicky (struktury tumoru mezi kostními trávci anebo pod respiračním epitelem sinů)
<b>Proliferace:</b> minimálně 2 ze 3 následujících kritérií
- Ki67 $\geq 3$ % u formaldehydové fixace ( $> 1$ % u fixace Bouin-Hollandovým roztokem)
- $> 2$ mitózy/ 10 HPF
- Pozitivita p53: $>10$ silně pozitivních jader/ 10 HPF
<b>Výsledný grade:</b>
- 1a – neinvazivní adenom
- 1b – neinvazivní proliferující adenom
- 2a – invazivní adenom
- 2b – invazivní proliferující adenom
- 3 – karcinom (přítomnost metastáz v likvorových cestách či hematogenních metastáz)

#### 4.5.4 Závěr

Klasifikace somatotropních tumorů podle jejich potenciálních prognostických parametrů má klinický význam a některé prognostické parametry dosahují ve velkých statistických souborech poměrně robustní spolehlivosti (např. SGST subtyp, grading dle Trouillas, grade dle Hardyho a Knospa). Tyto parametry však mohou mít v individuálních případech stále ještě omezenou výpovědní hodnotu a podtrhují tak potřebu další explorační a charakterizační faktorů, které by umožnily predikovat vývoj onemocnění u pacientů s akromegálií.

### 4.6. Somatostatin, somatostatinová analoga, somatostatinové receptory, jejich struktura, funkce, exprese a prediktivní význam v somatotropních PitNETech

#### 4.6.1 Struktura a genetika somatostatinových receptorů

V lidském těle existuje celkem 5 genů pro somatostatinové receptory, jež se označují SSTR1-5(83, 84). Geny kódují celkem 8 různých peptidů, včetně dvou isoform SSTR2 a 3 isoform SSTR5. SSTR2 existuje ve dvou sestríhových isoformách označovaných SSTR2A (dlouhá isoforma) a SSTR2B (krátká isoforma), kdy v lidském těle výrazně převažuje isoforma SSTR2A(84, 85). Isoforma SSTR2B se vyskytuje hlavně u myši(85, 86), ačkoliv v lidském těle byl její výskyt popsán též (86, 87). SSTR5 existuje ve třech isoformách – klasické a dále ve dvou sestríhových variantách s redukováným počtem transmembránových domén(88). SSTR1 je kódován genem na chromozomálním lokusu 14q13, SSTR2 na 17q24, SSTR3 na 22q13.1, SSTR4 na 20p11.2 a SSTR5 na 16p13.3 (83). Velikost všech SSTR se pohybuje mezi 356 – 391 aminokyselinami a proteiny sdílí identické peptidické sekvence v rozsahu 39–57 %, především v oblastech transmembránových domén(83, 89).

Struktura SSTR proteinů odpovídá ostatním receptorovým proteinům asociovaným s G proteinem: N-konec proteinu je lokalizován extracytoplasmaticky a přechází do první transmembránové domény. Všechny SSTR obsahují 7 transmembránových domén se sekundární konformací  $\alpha$ -helixu. Ty jsou spojeny 3 intracelulárními peptidovými smyčkami a 3 extracelulárními peptidovými smyčkami. Osmá  $\alpha$ -helikální doména je lokalizována intracytoplasmaticky poblíž C-konce peptidu(90).

#### 4.6.2 Struktura a farmakokinetika somatostatinu

Somatostatin je endogenní peptidický hormon produkovaný v různých tkáních včetně centrálního nervového systému. Hormon je syntetizován jako prosomatostatinový prekurzorový peptid o 92 aminokyselinách, jenž je konvertázovými enzymy štěpen na dvě biologicky aktivní formy – somatostatin-14 a somatostatin-28 o 14 respektive 28

aminokyselinách(83, 91). Somatostatin zodpovědný za hypotalamohypofyzární regulaci je představován převážně 14 aminokyselinovou formou, jež je syntetizována především neurony v nucleus periventricularis anterior hypothalamu, z nichž se axonálními zakončeními přes eminentia mediana dostává do portálního hypofyzárního oběhu v hypofyzární stopce(89). Somatostatin—28 vykazuje nejvyšší afinitu k somatostatinovému receptoru 5 (SSTR5), somatostatin-14 vykazuje srovnatelnou afinitu k somatostatinovým receptorům 1-4 (SSTR1-4)(92). Poločas somatostatinu-14 je krátký (cca 2 minuty)(91): část hormonu je degradována peptidázovou aktivitou séra a další část je po vazbě na receptory internalizována a rozštěpena v endosomálním kompartmentu buňky (89, 91).

#### **4.6.3 Farmakologické charakteristiky klinicky užívaných somatostatinových analog (SSA)**

Somatostatinová analoga jsou přípravky vykazující obdobné farmakodynamické účinky jako somatostatin po vazbě na somatostatinové receptory. V současné době jsou v klinické praxi užívána tři somatostatinová analoga: oktreotid, lanreotid a pasireotid(91, 93). Oktreotid a lanreotid náleží k tzv. první generaci SSA s nejvyšší afinitou k SSTR2 a nízkou afinitou k ostatním SSTR, pasireotid náleží do druhé generace a vyznačuje se i afinitou k ostatním SSTR, dostatečnou pro farmakologický účinek zprostředkovaný těmito receptory (SSTR1, 3, 5)(94). V terapii se používají především formy s prodlouženým účinkem (Oktreotid LAR a Lanreotid Autogel), podávané jednou za 3-4 týdny (95, 96). Oktreotid jeví nejvyšší afinitu k SSTR2, následně SSTR5, následně SSTR3 a nejméně k SSTR1 a SSTR4 (SSTR2>>SSTR5>SSTR3>>SSTR1>>>SSTR4)(91, 94). Lanreotid vykazuje nejvyšší afinitu k SSTR2, dále k SSTR3, dále k SSTR5 a nejmenší k SSTR1 a SSTR4 (SSTR2>>SSTR3>SSTR5>>SSTR1>SSTR4) (91, 94). Pasireotid náleží ke druhé generaci SSA. Na rozdíl od oktreotidu a lanreotidu vykazuje vyšší afinitu k SSTR1, 3 a 5, jež je dostatečná pro navození farmakologického účinku prostřednictvím těchto receptorů (94, 97). Nejvyšší afinitu vykazuje pasireotid k SSTR5, dále k SSTR2, dále k SSTR3 a dále k SSTR1 a SSTR4 (SSTR5> SSTR2>SSTR3>>SSTR1>>>SSTR4)(91, 94). Přesné hodnoty vazebných afinit pro všechny tři SSA jsou uvedeny v Tabulce 4.6.



Tabulka 4.6 – Hodnoty vazebných afinit somatostatinu a klinicky používaných SSA k jednotlivým subtypům SSTR (dle (91)). Afinity jsou udány v IC<sub>50</sub> (nM); čím nižší je hodnota, tím vyšší je afinita látky k danému receptoru.

	SSTR1	SSTR2A	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Somatostatin-14	0,1 - 2,26	0,2 - 1,3	0,3 - 1,6	0,3 - 1,8	0,2 - 0,9
Somatostatin-28	0,1 – 2,2	0,2 – 4,1	0,3 – 6,1	0,3 – 7,9	0,05 – 0,4
Oktreotid	575	0,4	38	>1000	9
Lanreotid	180	0,5	14	230	17
Pasireotid	9,3	1	1,5	>100	0,16

#### 4.6.4. Obecné signalizační mechanismy a efektorové dráhy somatostatinového systému

##### 4.6.4.1 Buněčné účinky signalizace prostřednictvím SSTR

Hlavní signalizační aktivita SSTR je Gα dependentní: po vazbě receptorového ligandu dochází k aktivaci heterotrimerického G-proteinu, disociaci Gα podjednotky a k zahájení vlastního procesu signalizace(90). Gα podjednotka inhibuje aktivitu adenylátcyklázy a následně proteinkinázy A (PKA)(92, 98-100). Gα dále interaguje prostřednictvím serin/threoninových fosfatáz s kaliovými a kalciovými membránovými kanály což vede k poklesu intracelulární hladiny kalcia(101). Oba mechanismy díky poklesu intracelulární hladiny druhých posílů (Ca<sup>2+</sup>, cAMP) vedou k inhibici buněčné exocytózy a tím k inhibici hormonální sekrece neuroendokrinních buněk (89, 92, 99, 100). Dalším cílem Gα proteinu jsou tyrosinfosfatázové proteinázy (PTP), především SHP1, SHP2 a DEP1 (92, 99, 100). Tyto fosfatázy v buňce komplexně interagují s dalšími signalizačními drahami (např. PI3K/AKT, NFκ-B, JNK, MAPK, JAK/STAT, Rho a signalizační dráhy cGMP a PLC), jejichž aktivace má antiproliferační efekt(92, 102), a proapoptotický efekt (103, 104). Blíže jsou signalizační mechanismy spojené s jednotlivými subtypy SSTR popsány např. v (92). Somatostatin má dále inhibiční účinky na angiogenezi: signalizace prostřednictvím SSTR reguluje a snižuje sekreci VEGF v PitNETech (105, 106). SSTR1, 2 a 3 jsou též exprimovány přímo na endoteliálních buňkách(107, 108), kde somatostatinová signalizace inhibicí MAPK dráhy a interakcí s endoteliální NO-syntázou přímo inhibuje angiogenezi (109).

##### 4.6.4.2 Přehled role jednotlivých subtypů SSTR v signalizačních drahách

Somatostatinová signalizační dráha prostřednictvím somatostatinových receptorů má v buňkách antisekreční (SSTR1-5), antiproliferační (SSTR1, 2, 4 a 5), antiangiogenní (SSTR1-3) a proapoptotické účinky (SSTR2 a 3)(92, 99). Předpokládá se, že v PitNETech se při terapii uplatňují především účinky antiproliferační(64). Obecně lze říci, že signalizační

mechanismy SSTR receptorů a jejich účinky na buněčné procesy jsou komplexní a zahrnují interakce mezi různými, navzájem nezávislými intracelulárními signalizačními kaskádami.

#### **4.6.5 Kinetika somatostatinových receptorů**

Jednotlivé SSTR se svou celulární kinetikou odlišují(89, 91, 110, 111). U mnoha receptorů spojených s G-proteinem dochází po vazbě ligandu k fosforylaci receptoru a internalizaci do endosomálního buněčného kompartmentu, čímž dochází ke zpětnovazebnímu potlačení aktivity signálu (112). Receptor může být následně rozštěpen, anebo recyklován zpět na buněčnou membránu. Internalizace receptoru po vazbě somatostatinu je dobře popsána v případě SSTR2A(110, 111, 113, 114) a SSTR3(110, 115), nedochází k ní však v případě SSTR1 (110, 111, 114). Kinetika SSTR5 není dosud zcela objasněná (110, 116) (111, 117). Receptory spojené s G-proteinem mohou též po vazbě ligandu vytvářet dimery a oligomery. Tyto mohou mít homonomní či heteronomní charakter(118). Dimerizace, a především heterodimerizace mění funkční vlastnosti receptorového dimeru, afinitu k jednotlivým receptorovým ligandům a dále kinetiku receptoru(118-121). Tvorba heterodimerů ovlivňující funkci receptorů byla popsána mezi SSTR1 a SSTR5, SSTR2 a SSTR3, SSTR2 a SSTR5 a SSTR5 a D2DR; detailní diskuze funkčních dopadů této interakce jsou nad rámec této práce a lze se s nimi seznámit v (118-121).

#### **4.6.6 Exprese a význam jednotlivých subtypů SSTR v buňkách Pit1<sup>+</sup> linie normální hypofýzy.**

Všechny SSTR s výjimkou SSTR4 jsou exprimovány v buňkách normální hypofýzy(89, 91, 122-124). Vazba somatostatinu vede výše popsaným mechanismem k poklesu cAMP a inhibici exocytózy růstového hormonu z buněk. Obdobnými mechanismy dochází k inhibičním účinkům somatostatinu na sekreci laktotropních i thyreotropních buněk(89). V části studií je též uváděna transkripční down-regulace STH následkem SSTR signalizace, tato však nebyla v jiných studiích potvrzena. Hlavní význam pro somatostatinovou signalizaci v somatotropních buňkách má především SSTR2 a méně SSTR5; jejich exprese je v tomto buněčném subtypu nejvyšší (89). Na podkladě studií inhibice sekrece v prolaktinomech se usuzuje, že inhibiční účinky na sekreci prolaktinu jsou zprostředkované především SSTR5 signalizací, s podílem SSTR1 (89), zatímco inhibiční účinky na sekreci TSH jsou zprostředkovány opět SSTR2 a SSTR5 signalizací(89).

#### **4.6.7 Exprese jednotlivých subtypů SSTR v somatotropních PitNETech.**

##### *4.6.7.1 Metodiky studia exprese SSTR, jejich výhody a limitace*

Expresse jednotlivých subtypů SSTR v buňkách somatotropních adenomů byla opakovaně studována imunohistochemicky na úrovni exprese proteinů i molekulárně genetickými metodami (RT-Q-PCR) a to jak před léčbou SSA, tak po léčbě. Přestože kvantitativní stanovení mRNA je ve srovnání se semikvantitativními proteomickými metodami technicky přesnější, může po transkripci mRNA docházet k dodatečné regulaci genové exprese epigenetickými mechanismy (např. pomocí RNA interference) a dále může docházet dalšími potranslačními pochody k variabilní senescenci a turn-overu jednotlivých proteinů: proto poskytují proteomické metody přesnější údaje o reálné přítomnosti detekovaných proteinů. Výsledky proteomických analýz naopak nepříznivě definuje a ovlivňuje senzitivita a specifita protilátek užívaných k detekci a dále posttranslační modifikace, jež mohou narušovat antigenicitu detekovaných epitopů. V tomto ohledu bývá uváděna vyšší senzitivita a specifita nových klonů UMB1 (anti-SSTR2), UMB4 (anti-SSTR5), UMB5 (anti-SSTR3) a UMB7 (anti-SSTR1) ve srovnání s dříve používanými polyklonálními protilátkami a v tomto kontextu je nutné interpretovat některé starší imunohistochemické studie(125-128).

#### 4.6.7.2 Expresse SSTR1 v somatotropních tumorech

Expresse SSTR1 byla v somatotropních adenomech identifikována opakovaně molekulárně geneticky i imunohistochemicky. Shrnutí analyzovaných studií je uvedeno v tabulce 4.7; v případě, že některé studie použili více metodických přístupů, jsou jejich výsledky v tabulce uvedeny zvlášť. V případě, že studie používaly totožnou metodiku a došli ke stejnému závěru, jsou uvedeny sloučeně.

Tabulka 4.7 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí SSTR1 v somatotropních tumorech

Metodika	Celkový počet pacientů	Výsledek, komentář	Studie
RT-qPCR	174	Nejnižší exprese ve srovnání se SSTR2, 3 a 5	(129-132)
RT-qPCR	61	Nízká exprese v porovnání se SSTR2, ale srovnatelná se SSTR3, bez rozdílu mezi DGST a SGST	(61, 133)
IHC	28	Cytoplasmatická anebo membránová exprese v 25 % nádorů, pozitivní korelace imunohistochemie s RT-qPCR	(61)
IHC	33	Cytoplasmatická exprese v 79 % tumorů, bez vlivu předchozí terapie SSA	(134)
IHC	65	Cytoplasmatická exprese v 52 % tumorů, bez vlivu předchozí terapie SSA	(114)

Z uvedeného souhrnu vyplývá, že exprese SSTR1 byla ve většině případů nízká ve srovnání s ostatními receptory a intenzita exprese stanovená imunohistochemickou reakcí se nelišila mezi tumory vystavené před operací léčbě SSA. Expresse SSTR1 byla detekována převážně v cytoplasmě; tato lokalizace byla popsána též v dalších studiích zabývajících imunohistochemickou detekcí SSTR1(128, 135) a odráží nejspíše intracelulární kinetiku receptoru.

#### *4.6.7.3 Expresse SSTR2 v somatotropních tumorech*

Expresse SSTR2 byla extenzivně studována, neboť SSTR2 je považován za hlavní efektor antisekrečních a antiproliferačních účinků somatostatinu a SSA v somatotropních PitNETech (viz dále). Shrnutí analyzovaných studií je uvedeno v tabulce 4.8; v případě, že některé studie použili více metodických přístupů, jsou jejich výsledky v tabulce uvedeny zvlášť. V případě, že studie používaly totožnou metodiku a došli ke stejnému závěru, jsou uvedeny sloučeně. Dvě ze studií se zabývaly též expresí SSTR2 u nádorů s koexpresí prolaktinu; v jedné ze studií byla u těchto tumorů exprese SSTR2 srovnatelná s DGST a signifikantně vyšší než v SGST (81). Ve druhé studii se pak nebyl přítomný vliv koexprese prolaktinu na expresi SSTR2(125). Některé studie dále porovnávaly vliv předchozí léčby SSA na expresi SSTR2: zatímco ve dvou studiích byl přítomen signifikantní pokles imunohistochemicky stanovené exprese SSTR2(114, 134), další dvě studie však pomocí RT-qPCR nezaznamenaly signifikantní rozdíl mezi těmito podskupinami nádorů (130, 131). Imunohistochemická pozitivita byla ve většině studií membránového charakteru. Cytoplasmatická pozitivita bývá spojována jednak s technickými artefakty při imunohistochemické reakci a dále s neaktivní formou internalizovaného receptoru(125); ve studiích užívajících klon protilátky UMB1 se téměř nevyskytovala (114, 125, 126), byla však častější v případě jiných protilátek(61, 136).

Tabulka 4.8 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí SSTR2 v somatotropních tumorech

Metodika	Celkový počet pacientů	Výsledek, komentář	Studie
RT-qPCR	135	Druhá nejvyšší exprese po SSTR5	(129, 130, 132)
RT-qPCR	39	Nižší exprese ve srovnání se SSTR3 a SSTR5, srovnatelná exprese mezi pacienty s předchozí léčbou SSA a bez léčby	(131)
RT-qPCR	26	Expresce ve všech tumorech, bez signifikantní korelace s klinickými vlastnostmi	(137)
RT-qPCR	61	Nejvyšší exprese ve srovnání s ostatními SSTR, signifikantně vyšší exprese v DGST oproti SGST	(61, 133)
RT-qPCR	13	Expresce ve všech tumorech	(138)
IHC	61	Signifikantně vyšší exprese v DGST oproti SGST	(61, 133)
IHC	55	Pozitivní v 70 % tumorů, signifikantní korelace imunohistochemie s RT-qPCR, bez rozdílu v expresi mezi pacienty s předchozí léčbou SSA a bez léčby	(130)
IHC	60	Expresce v 93 % tumorů, signifikantně vyšší exprese v DGST oproti SGST	(125)
IHC	25	Expresce ve všech tumorech, bez signifikantní korelace s klinickými vlastnostmi a RT-qPCR	(137)
IHC	25	Expresce v 84 % tumorů	(126)
IHC	13	Expresce v 92 % tumorů	(138)
IHC	65	Expresce v 99 % tumorů, signifikantně nižší exprese u pacientů s předchozí léčbou SSA	(114)
IHC	34	Expresce ve všech tumorech bez předchozí léčby SSA ve srovnání s expresí v 65 % tumorů po léčbě SSA	(134)
IHC	22	Expresce ve všech tumorech	(139)
IHC	52	Signifikantně vyšší exprese v DGST ve srovnání s SGST	(81)
IHC	78	Signifikantně vyšší exprese v DGST ve srovnání s SGST	(62)
IHC	112	Expresce ve všech tumorech	(136, 140)

#### 4.6.7.4 Expresce SSTR3 v somatotropních tumorech

Expresce SSTR3 byla v somatotropních adenomech identifikována molekulárně geneticky i imunohistochemicky. Shrnutí analyzovaných studií je uvedeno v tabulce 4.9; v případě, že některé studie použili více metodických přístupů, jsou jejich výsledky v tabulce uvedeny

zvlášť. V případě, že studie používaly totožnou metodiku a došli ke stejnému závěru, jsou uvedeny sloučeně.

Tabulka 4.9 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí SSTR3 v somatotropních tumorech

Metodika	Celkový počet pacientů	Výsledek, komentář	Studie
RT-qPCR	39	Druhá nejvyšší exprese po SSTR5, vyšší exprese ve srovnání se SSTR2	(131)
RT-qPCR	22	Expres v 86 % tumorů, nižší ve srovnání se SSTR2	(129)
RT-qPCR	28	Obdobná exprese jako SSTR1, výrazně nižší exprese ve srovnání se SSTR2	(67)
RT-qPCR	33	Nižší exprese ve srovnání se SSTR2, nižší exprese v SGST oproti DGST, avšak ne signifikantně	(133)
RT-qPCR	113	Nižší exprese v tumorech ve srovnání se SSTR2	(130, 132)
IHC	55	Expres v 69 % tumorů, bez korelace s RT-qPCR	(130)
IHC	33	Bez rozdílné exprese v SGST oproti DGST	(133)
IHC	28	Expres v 46 % tumorů, bez rozdílné exprese v SGST oproti DGST	(67)
IHC	65	Expres v 86 % tumorů, bez vlivu předchozí terapie SSA	(114)
IHC	33	Expres v 24 % tumorů, bez vlivu předchozí terapie SSA	(134)

Ani v jedné ze studií nebyla pozorována korelace mezi expresí SSTR3 a dalšími klinickopatologickými parametry. Ve všech citovaných pracích měla imunohistochemická exprese charakter membránové a často také cytoplasmatické positivity.

#### 4.6.7.5 Expres SSTR4 v somatotropních tumorech

Údaje o expresi SSTR4 jsou protichůdné: v jedné ze studií nebyla pomocí RT-qPCR detekována v normální hypofyzární tkáni ani v tumorech(123), jiná studie obdobnou metodikou potvrdila absenci exprese v normální hypofyzární tkáni, ale detekovala přítomnost mRNA SSTR4 přítomnost v 1 ze 3 analyzovaných somatotropinů(124). Novější studie identifikovala mRNA SSTR4 v 9 z 22 somatotropinů (40 %), hladina exprese však byla nejnižší ze všech SSTR (129); obdobný byl výsledek i v další studii(61), kde se navíc imunohistochemicky nezdařilo detekovat SSTR4 ani v jednom z 28 případů. Jiné studie nedetekovaly mRNA SSTR4 ani v jednom z celkových 111 analyzovaných tumorů(131-133).

Z těchto důvodů nebyla exprese SSTR4 v části dalších studií zkoumána a soudí se, že signalizace prostřednictvím SSTR4 nehraje v somatotropních tumorech větší roli.

#### 4.6.7.6 Exprese SSTR5 v somatotropních tumorech

SSTR5 je obdobně jako SSTR2 exprimován ve většině somatotropních adenomů. Shrnutí analyzovaných studií je uvedeno v tabulce 2.10; v případě, že některé studie použili více metodických přístupů, jsou jejich výsledky v tabulce uvedeny zvlášť. V případě, že studie používaly totožnou metodiku a došli ke stejnému závěru, jsou uvedeny sloučeně.

Tabulka 4.10 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí SSTR5 v somatotropních tumorech

Metodika	Celkový počet pacientů	Výsledek, komentář	Studie
RT-qPCR	22	Nejvyšší exprese ve srovnání s ostatními SSTR	(129)
RT-qPCR	28	Druhá nejvyšší exprese po SSTR2, vyšší exprese v SGST oproti DGST	(61)
RT-qPCR	33	Signifikantně vyšší exprese v SGST oproti DGST	(133)
RT-qPCR	152	Nejvyšší exprese ve srovnání s ostatními SSTR	(130-132)
IHC	55	Pozitivní v 67 % tumorů, bez korelace s RT-qPCR	(130)
IHC	28	Expresí pouze v SGST	(67)
IHC	60	Expresí v 83 % tumorů, bez rozdílů mezi DGST, SGST a nádory s koexpresí prolaktinu	(125)
IHC	33	Expresí častěji v SGST ve srovnání s DGST (nesignifikantní), korelace s RT-qPCR	(133)
IHC	22	Expresí v 95 % tumorů (oproti 100 % tumorů u SSTR2)	(146)
IHC	25	Expresí v 100 % tumorů (oproti 84 % tumorů u SSTR2)	(126)
IHC	65	Expresí v 89 % případů, bez vlivu předchozí terapie SSA	(114)
IHC	34	Expresí v 88 % případů, bez vlivu předchozí terapie SSA	(134)

V uvedených studiích byla pozorována membránová a cytoplasmatická imunohistochemická exprese SSTR5; ve studiích používajících monoklonální protilátku UMB4 výrazně převládala očekávaná membránová pozitivita (114, 125, 126), zatímco protilátka použitá v (61) vykazovala v podstatě pouze cytoplasmatickou pozitivitu.

#### 4.6.7.7 Kritické zhodnocení exprese jednotlivých subtypů SSTR v somatotropních tumorech

Uvedené údaje mapují expresi jednotlivých receptorů na relativně velkém a převážně recentním souboru somatotropinomů za pomoci RT-qPCR (celkově 235 případů pro SSTR1, SSTR3, SSTR4 a SSTR5, 248 případů s analýzou SSTR2)(61, 129-131, 133, 138) a imunohistochemie (celkově 293 případů pro SSTR1, SSTR3, 316 pro SSTR5 a celkově 528 případů pro SSTR2)(61, 62, 81, 114, 125, 126, 132, 133, 136-140). Výsledky studií se v některých ohledech lišily; roli mohla hrát povaha souboru, která v části studií nebyla z patologického hlediska přesně definovaná a též metodické faktory (rozdílná kritéria kvantitativního hodnocení exprese; viz sekce 4.6.10.3.2). Další hlubší diskuze příčin těchto odlišností je mimo rámec této práce. Obecně z uvedeného vyplývá, že SSTR4 v podstatě není v somatotropinomech exprimován, případně je exprimován pouze v nízkém množství a většina studií se jím z těchto důvodů dále nezabývá. Exprese SSTR1 je ve většině studií nízká, a to jak na úrovni molekulárně genetické, tak imunohistochemické. V citovaných pracích nebyla přímo analyzována korelace mezi výsledky RT-qPCR a imunohistochemie, avšak nepřímou (např. z imunohistochemické analýzy v(114)) lze usuzovat, že výsledky obou metod spolu souvisí. Exprese SSTR2 byla opakovaně prokázána ve většině analyzovaných somatotropinomů: imunohistochemická analýza korelovala s RT-qPCR(130, 131, 138), případně vykazovala pozitivní korelační trend(137). SSTR2 vykazoval nižší expresi v SGST ve srovnání s DGST, což bylo zaznamenáno v několika studiích(61, 62, 81, 125). Exprese SSTR3 hodnocená RT-qPCR byla obecně výrazně nižší ve srovnání s expresí imunohistochemicky detekovanou. V jedné ze studií nebyla pozorována korelace mezi oběma metodami(130), ve zbývajících nebyla tato problematika přímo analyzována. Příčina tohoto nálezu je nejasná, diskrepanci mezi nízkou transkripcí a vysokým množstvím detekovatelného proteinu (srovnatelného s transkripčně mnohem více aktivními geny SSTR2 a SSTR5(130)) lze nejspíše částečně vysvětlit odlišnou intracelulární kinetikou receptoru, neboť většina SSTR3 je po internalizaci recyklována zpět na buněčnou membránu a k degradaci v endosomálním kompartmentu dochází pouze cca ve 20 %(115). Dále může intracelulární koncentraci SSTR3 zvyšovat tvorba heterodimerů se SSTR2, která zabraňuje internalizaci SSTR3 po předchozí vazbě na SSTR2(118). Ve většině studií s výjimkou jediné(131) byla exprese SSTR3 na úrovni mRNA nižší, než v případě SSTR2 a SSTR5. Exprese SSTR5 byla na úrovni mRNA detekována v naprosté většině somatotropinomů a spolu s mRNA SSTR2 byla exprimována v největším množství. Obdobně bylo možné identifikovat expresi SSTR5 ve většině analyzovaných případů imunohistochemicky. Vztah imunohistochemické exprese a exprese mRNA byl přímo analyzován pouze v jediné studii(130), bez průkazu statisticky



signifikanční korelace mezi oběma metodami detekce. Některé práce dále uváděly vyšší expresi SSTR5 v podskupině SGST (61, 133), jiné však tento náleznepotvrdily(125).

#### **4.6.8 Klinické aspekty léčby SSA u somatotropních tumorů a klinický význam resistance na léčbu SSA**

##### *4.6.8.1 Klinická odpověď somatotropních tumorů na léčbu SSA*

Somatostatin a somatostatinová analoga působí v somatotropních PitNETech prostřednictvím somatostatinových receptorů. Podání SSA vede u pacientů k poklesu sekreční aktivity tumoru, k redukci hladin STH a IGF-1 v krevním oběhu (141, 142) a dále k redukci objemu tumorů(64, 142). Redukce STH/IGF-1 na normální úroveň a redukce objemu tumoru jsou dvě nejčastěji hodnocené veličiny v případě posuzování léčebné odpovědi(64). V klinické praxi není pozitivní odpověď tumoru na léčbu SSA pravidlem. Biochemická remise definovaná normalizací hladin STH a IGF1 je dosažena pouze u části pacientů, přičemž údaje o normalizaci značně kolísají a v různých studiích se pohybují mezi 25 % až 79 % (143). Obdobný charakter mají údaje o redukci nádorového objemu, jež se v signifikantní míře (definovaná ve většině případů jako pokles o>20 % objemu) vyskytovala u 19 % až 85 % pacientů (143). Příčina této variability je podmíněná mimo jiné rozdílnou konstrukcí jednotlivých studií, odlišnostmi ve složení kohort pacientů, odlišnostmi v schématech dávkování, použitých přípravcích a též v kritériích užitých pro hodnocení odpovědi na léčbu. Současně tato data ilustrují přítomnost variabilního podílu pacientů, kteří na léčbu SSA nereagují anebo reagují, avšak nedostatečně; jako resistance na léčbu SSA je obvykle považováno nedosažení biochemické remise anebo redukce tumoru o méně než 20 % objemu anebo růst tumoru během léčby(99, 144). Obě odpovědi (biochemická remise a redukce velikosti tumoru) spolu obvykle souvisí, v některých případech se však mohou vyskytnout nezávisle na sobě(99).

##### *4.6.8.2 Klinické prediktory odpovědi na léčbu SSA a jejich význam*

Jako klinický prediktor odpovědi na léčbu SSA se uvádí míra redukce IGF1 po 12 měsících léčby a redukce objemu tumoru po 3 měsících léčby(99, 143, 144). Jako další možné prediktivní faktory léčebné odpovědi je uváděno ženské pohlaví, vyšší věk, větší objem tumoru a nižší hladina cirkulujícího IGF1 v době diagnózy(144). Naopak, jiné studie nezaznamenaly vztah mezi léčebnou odpovědí a velikostí tumoru, věkem, pohlavím a vstupní hladinou IGF1(81, 130, 141, 143). V některých studiích korelovala biochemická odpověď s redukcí objemu tumoru, v jiných nebyla tato korelace pozorována a dobře známé jsou

případy, kdy došlo buďto jen k biochemické odpovědi anebo pouze k redukci objemu tumoru(99, 143).

#### *4.6.8.3 Histologické prediktory odpovědi na léčbu SSA*

Jako patologický prediktor bývá nejčastěji uváděn subtyp tumoru: u DGST bývá odpověď na léčbu vyšší nežli u SGST(62, 81, 82, 145), roli zde hraje nejspíše diferenciální exprese SSTR subtypů a především SSTR2 (viz sekce 4.6.7). V některých publikacích dále patřila mezi prediktivní faktory exprese E-cadherinu v buňkách PitNETů(62, 145, 146), tato problematika je diskutována blíže v sekci 4.8. Samotný význam imunohistochemického hodnocení exprese jednotlivých subtypů SSTR je diskutován v sekci 4.6.10.

#### *4.6.8.4 Klinický význam resistance na léčbu SSA u somatotropních tumorů*

Možnost identifikovat pacienty, pro které léčba SSR nepředstavuje terapeutický benefit je důležité, protože 1) tyto pacienti mohou primárně více profitovat z jiných léčebných modalit, 2) u těchto pacientů nemusí docházet k léčebnému prodloužení na podkladě aplikace neúčinné léčby, 3) by bylo možné redukovat finanční náklady na jinak neúčinnou léčbu, 4) u těchto pacientů by bylo možné předejít vedlejším účinkům jinak neúčinné léčby. Lze předpokládat, že identifikace těchto pacientů na histologické úrovni by měla ve srovnání s identifikací na klinické úrovni větší význam, neboť zatímco výsledky histologického vyšetření jsou obvykle dostupné v řádu dní, v případě v současné době postulovaných klinických prediktorů (pokles IGF1 a redukce objemu po třech měsících léčby) je hodnocení časově náročnější a implikuje významně vyšší prodlevu. Z výše uvedených důvodů byly mechanismy resistance PitNETů na léčbu SSA extenzivně studovány.

#### **4.6.9 Potenciální mechanismy resistance na léčbu SSA v somatotropních PitNETech**

Mechanismy resistance u pacientů nereagujících na léčbu SSA nejsou plně objasněny. Postulovány byly tři možné příčiny: inaktivační mutace genů kódujících SSTR, porucha mechanismů signálních kaskád zprostředkávajících SSTR signalizaci a variabilní exprese SSTR v tumorech(99). Inaktivační mutace *SSTR* genů jsou v somatotropních PitNETech raritní(99, 100, 147) a vzhledem k relativně časté absenci klinické odpovědi (viz sekce 4.6.8.1) se na resistenci nejspíše výrazněji nepodílejí. Ve dvou velkých studiích zkoumajících genom somatotropních PitNETů pomocí NGS se podařilo identifikovat četnější výskyt mutací v signálních kaskádách cAMP a intracytosolického kalcia, avšak studie nezahrnovaly údaje o odpovědi na léčbu. Popsané mutace neměly rekurentní charakter(52, 53). Jediná dobře popsaná genetická alterace v somatotropních tumorech, která vede

k resistenci na léčbu SSA, byla identifikována v genu *AIP* (aryl hydrocarbon receptor interacting protein). Porucha funkce *AIP* vede k narušení  $G_{\alpha_i}$  signalizační dráhy. K tomu dochází jak v případě mutace vlastního proteinu, tak v případě jeho snížené exprese, jež byla popsána u části resistantních tumorů. Resistence však nepostihovala odpověď na léčbu pasireotidem, což implikuje selektivní poruchu signalizace SSTR2 v patogenezi resistance u *AIP* deficientních tumorů(147, 148). Role *AIP* je in extenso diskutována v sekci 4.9. Role diferenciální exprese jednotlivých SSTR je in extenso diskutována v sekci 4.6.10.

#### **4.6.10 Prediktivní význam exprese jednotlivých SSTR v somatotropních PitNETech.**

##### *4.6.10.1 Obecné faktory ovlivňující odpověď na léčbu SSA*

Působení SSA v cílových buňkách je podmíněno vazbou na somatostatinové receptory (SSTR): definující roli v rámci SSA signalizace tedy hraje 1) exprimovaný subtyp receptoru, 2) kvantita exprese receptoru, 3) membránová lokalizace receptoru a jeho intracelulární kinetika a 4) tvorba heterodimerů s jinými subtypy SSTR. Výše uvedené parametry exprese SSTR byly ve vztahu k predikci odpovědi somatotropních adenomů na léčbu SSA studovány v několika studiích. Vzhledem k údajům o minimální expresi SSTR4 (viz sekce 4.6.7.5) a výrazně nízké afinitě k užívaným SSA (viz sekce 4.6.3) nebude subtyp SSTR4 dále diskutován.

##### *4.6.10.2 Prediktivní význam exprese SSTR1*

Informací o prediktivním významu SSTR1 je relativně málo vzhledem k velmi nízké expresi v tumorech (viz sekce 4.6.7.2). Jedna ze studií nenalezla statisticky významný rozdíl imunohistochemické exprese SSTR1 ve skupině pacientů reagujících na léčbu SSA ve srovnání s pacienty, kteří na léčbu nereagovali(134). V jiné ze studií byla exprese SSTR1 signifikantně vyšší u pacientů s pozitivní odpovědí na léčbu (130). Třetí studie pak našla signifikantně vyšší expresi SSTR1 ve skupině pacientů, kteří na léčbu odpověděli, přičemž hladina exprese pozitivně korelovala s redukcí objemu tumoru a s biochemickou odpovědí v podobě normalizace hladin IGF1(131). Je otázkou, nakolik jsou tato data terapeuticky relevantní vzhledem k nízké afinitě nejčastěji užívaných SSA (oktreotid a lanreotid) k receptoru (viz sekce 4.6.3). Nelze však vyloučit, že v budoucnu, s častějším využitím pasireotidu, bude role SSTR1 v tomto kontextu zkoumána více.

##### *4.6.10.3 Prediktivní význam exprese SSTR2*

###### *4.6.10.3.1 Přehled dat o prediktivním významu exprese SSTR2*

Odpověď somatotropních PitNETů na léčbu byla vzhledem k nejvyšší afinitě užívaných SSA dávana do kontextu právě s expresí SSTR2. Proto jsou údaje o prediktivním významu exprese ve srovnání s ostatními receptory poměrně extenzivní. V tabulce 4.11 následuje přehled relevantních studií pojednávajících tuto problematiku. V poli klinická odpověď jsou uváděny jen statisticky signifikantní výsledky. Nutné je poznamenat, že se studie velmi často lišily definicí parametru odpovědi na léčbu, a to jak časovým horizontem, kdy byla odpověď hodnocena, tak vlastní biochemickou definicí odpovědi. V některých pracích byla odpověď definována biochemickou normalizací hladin IGF1, v jiných pak např. redukcí hladin IGF1 o >50 %. Lišilo se také hodnocení exprese SSTR2 (viz sekce 4.6.10.3.2) a z těchto důvodů je exaktní srovnání uvedených dat obtížné.

#### *4.6.10.3.2 Kritické shrnutí prediktivního významu exprese SSTR2*

Jednotlivé výše citované práce se mezi sebou lišily v některých významných klinických parametrech, jako např. druh a schéma dávkování SSA, délka follow-up pacientů a hodnocená kritéria shrnující úspěšnost či neúspěšnost léčby. Ve většině případů byla hodnocená biochemická odpověď v podobě rozsahu procentuální redukce hladiny IGF1, část studií hodnotila prostřednictvím zobrazovacích metod také redukcí objemu tumoru. Metody měření exprese SSTR2 se lišily, v několika studiích se ukázalo, že exprese stanovená imunohistochemicky má vyšší prognostickou výpovědní hodnotu, nežli hodnocení pomocí RT-qPCR (130, 137) anebo pomocí western-blotu (149). Imunohistochemické hodnocení ve všech studiích mělo semikvantitativní charakter a obvykle integrovalo procento pozitivních buněk s intenzitou exprese. Několik studií používalo IRS skóre (114, 137), další studie používaly třístupňové škály kvantity exprese (130, 136, 149); nejčastější cut-off pro negativní skóre byla pozitivita méně 25 % buněk tumoru (136, 139, 149). Ve dvou studiích byla hodnocena pouze pozitivita a negativita na podkladě cut-off 10 % respektive 50 % pozitivních buněk tumoru (81, 134). Všechny výše citované práce se shodly na korelaci exprese SSTR2 s pozitivní biochemickou odpovědí na léčbu SSA, přičemž míra odpovědi byla obvykle vyšší u pacientů s vyšší expresí SSTR2; ve většině studií byla tato korelace statisticky signifikantní. Obdobně pozitivně korelovala exprese SSTR2 s redukcí objemu tumoru ve většině prací. Absence SSTR2 byla považována za významný negativní prognostický faktor pro odpověď na léčbu SSA (81, 130, 134, 136), nicméně ve studiích byla přítomna též část pacientů, která nereagovala na léčbu i přes identifikovatelnou expresi SSTR2 (81, 130, 136). I přestože je tedy na podkladě výše uvedených dat v současné době exprese SSTR2 hodnocena jako

v podstatě nejkonzistentnější a nejvýznamnější prediktivní faktor, hrají prediktivní roli též další faktory, jež dosud nebyly zcela přesně identifikovány. Ty jsou diskutovány v sekci 4.6.9.

Tabulka 4.11 – Přehled vybraných studií zabývajících prediktivní rolí SSTR2 v somatotropních PitNETech

Způsob hodnocení exprese SSTR2	Počet pacientů	Způsob hodnocení klinické odpovědi	Klinická odpověď	Citace
RT-qPCR	22	Pokles IGF1 (3 a 6 měsíců)	Signifikantně vyšší exprese u pacientů s dosaženou biochemickou kontrolou onemocnění	(129)
RT-qPCR, IHC	36	Pokles IGF1 (3 a 6 měsíců)	Ve skupině s vysokou IHC expresí odpověď na léčbu v 48 %, ve skupině s nízkou IHC expresí 0% odpověď na léčbu.	(130)
RT-qPCR	19	Redukce objemu tumoru	Kvantita exprese korelovala s procentuální redukcí objemu tumoru.	(131)
RT-qPCR, IHC	36	Pokles IGF1	Signifikantní korelace mezi IHC, ale nikoliv mRNA expresí a redukcí IGF1	(137)
IHC, western blot	20	Pokles IGF1 (6 měsíců)	Signifikantní korelace mezi IHC, ale nikoliv western blotem hodnocenou expresí a redukcí IGF1	(149)
IHC	60	Pokles IGF1 (3 a 6 měsíců)	Ve skupině s vysokou IHC expresí odpověď na léčbu v 53 %, ve skupině s nízkou IHC expresí 0% odpověď na léčbu. Exprese koreluje s odpovědí i u pacientů s neoadjuvantní léčbou SSA.	(136)
IHC	18	Pokles IGF1	Exprese SSTR2 u všech pacientů s dosaženou normalizací hladiny IGF1 (72 %), zbytek pacientů s expresí SSTR2 (17 %) a bez exprese SSTR2 (11 %)	(81)
IHC	20	Pokles STH, redukce objemu tumoru	Jediný případ bez exprese mezi 14 případy s biochemickou odpovědí na léčbu. Všechny případy bez odpovědi s absencí exprese. Exprese nekorelovala s redukcí objemu tumoru.	(134)

#### 4.6.10.4 Prediktivní význam exprese SSTR3

Problematika významu exprese SSTR3 v predikci odpovědi na léčbu SSA byla studována v několika studiích. Dvě práce (n=42) nenalezly signifikantní pozitivní korelaci mezi expresí

SSTR3 a redukcí hladin IGF1, a naopak pozorovaly negativní vztah mezi expresí SSTR3 a redukcí objemu, jež byla nižší anebo chyběla v tumorech s expresí SSTR3 (129, 134). Dvě práce (n=20) naopak zaznamenaly pozitivní korelaci mezi expresí SSTR3 a redukcí objemu tumoru (131, 150). Žádná souvztažnost mezi redukcí objemu tumoru anebo biochemickou odpovědí a expresí SSTR3 nebyla pozorována v dalších dvou pracích (114, 130). Význam exprese SSTR3 stran predikce odpovědi na léčbu SSA je tedy nejasný a vyžaduje další hlubší experimentální studium, jehož význam podtrhuje v současné době stále častější použití pasireotidu v klinické praxi.

#### *4.6.10.5 Prediktivní význam exprese SSTR5*

Problematika významu exprese SSTR5 v predikci odpovědi na léčbu SSA byla studována v několika studiích. V jedné studii (n=22) (129) byl přítomen pouze negativní korelační trend ( $p=0.07$ ) mezi expresí SSTR5 a poklesem hladin. Studie dále poukázala na prediktivní význam hodnocení poměru exprese SSTR2 a SSTR5, kdy podíl  $SSTR2/SSTR5 > 1,3$  představoval ve studii prediktor kontroly onemocnění; nelze však vyloučit, že nález odrážel přítomnost SGST a DGST ve studii, jež se často liší expresí obou receptorů a léčebnou odpovědí (viz sekce 4.6.7.3 a 4.6.7.6); tomu nasvědčují výsledky jiné studie, kde byl poměr  $SSTR2/SSTR5 > 1,3$  častěji identifikován právě ve skupině DGST (133). Ve zbývajících studiích nebyla korelace mezi redukcí objemu či biochemickou odpovědí a expresí SSTR5 pozorována (114, 130, 131, 134) a z těchto důvodů není SSTR5 obecně přičítán hlubší prediktivní význam. S častějším využitím pasireotidu v budoucnu však nelze vyloučit prohloubený zájem o problematiku SSTR5 v somatotropních PitNETech.

#### **4.6.11. Závěr**

Somatostatinová analoga užívaná při léčbě akromegalie působí na tumor prostřednictvím komplexních signálních drah aktivovaných po vazbě na somatostatinové receptory. Exprese receptorů se liší podle subtypů tumoru a podle druhu receptoru. Signalizace prostřednictvím SSTR inhibuje sekreční aktivitu tumoru (a pokles STH/IGF1) a dále též vede k redukcí objemu tumoru. Odpověď na SSA se výrazně liší mezi jednotlivými pacienty a neexistuje universální prediktor pozitivní odpovědi na léčbu; za nejvýznamnější prediktor odpovědi se v současné době považuje exprese SSTR2, jehož absence má vysokou negativní prediktivní hodnotu, avšak přítomnost SSTR2 odpověď na léčbu SSA nezaručuje. Z tohoto důvodu je nutné hledat další možné faktory a mechanismy určující léčebnou resistenci. Význam dalších podtypů SSTR je v současnosti sporný a výsledky jednotlivých studií

k tomuto tématu se neshodují, lze však předpokládat, že s častějším využitím novějších SSA s vyšší afinitou k SSTR5, 3 a 1 bude klinický význam těchto receptorů narůstat.

#### **4.7. Dopamin, dopaminový agonisté (DA), dopaminový receptor D2, jeho struktura, funkce, exprese a prediktivní význam v somatotropních PitNETech**

##### **4.7.1 Struktura a genetika dopaminových receptorů.**

V lidském těle existuje celkem pět genů kódujících dopaminové receptory (DR). Receptory jsou označovány D1, D2, D3, D4 a D5 a jejich kódující geny jsou umístěny na 5q35.1, 11q23.1, 3q13.3, 11p15.5 a respektive 4p16.1. Popsány byly dále dva pseudogeny, jež kódují nefunkční formy D5 receptoru. Geny kódující D1 a D5 neobsahují introny, zatímco geny pro zbývající receptory ano; díky tomu existuje D2DR ve dvou sestřihových isoformách – dlouhé (D2L) a krátké (D2S), postrádající exon 5 mezi intronem 4 a 5, kódovaný sekvencí v délce 87 párů bází(151, 152). Tato sekvence kóduje 29 aminokyselin ve 3. intracelulární peptidové smyčce, která se podílí na interakci s G proteinem (viz dále)(153).

Struktura proteinů DR odpovídá ostatním receptorovým proteinům asociovaným s G proteinem: N-konec proteinu je lokalizován extracytoplasmaticky a přechází do první transmembránové domény. Všechny DR obsahují 7 transmembránových domén se sekundární konformací  $\alpha$ -helixu. Ty jsou spojeny 3 intracelulárními peptidovými smyčkami a 3 extracelulárními peptidovými smyčkami. 8.  $\alpha$ -helix je lokalizován intracytoplasmaticky poblíž C-konce peptidu(90).

##### **4.7.2 Biochemie dopaminu a jeho farmakokinetika v hypotalamohypofyzárním systému**

Dopamin je katecholaminová substance odvozená z aminokyseliny tyrosinu a produkovaná v cytosolu dopaminergních neuronů centrálního i periferního nervového systému.

V hypotalamohypofyzárním systému je dopamin syntetizován především neurony v nucleus arcuatus a nucleus periventricularis. Dopamin je axony neuronů z nucleus arcuatus přepravován do eminentia mediana, odkud je uvolňován do perikapilárních prostor a přepravován portální cirkulací do adenohypofýzy. (154, 155).

##### **4.7.3 Dopaminový agonisté používaní v léčbě PitNETů**

V současné době se k léčbě prolaktinomů a somatotropních PitNETů užívá především ergotový derivát cabergolin, méně často bromokriptin a případně neergotový quinagolid(142, 153). Bromokriptin vykazuje nejvyšší vazebnou afinitu k D2DR, na nějž působí agonisticky, výrazně menší afinitu vykazuje k D1R, na nějž působí smíšeně agonisticky i antagonisticky. Vazba a parciální agonismus D1DR je zodpovědná za část vedlejších účinků (156).

Cabergolin je derivátem ergotových alkaloidů druhé generace a účinkuje jako agonista D2DR, k němuž vykazuje nejvyšší afinitu(157). Výrazně nižší afinitu a agonismus vykazuje též k D1DR(158). V několika studiích byl cabergolin ve srovnání s bromokriptinem signifikantně účinnější stran klinické a biochemické odpovědi na léčbu hyperprolaktinémie(156, 157). Quinagolid je vysoce selektivní k D2DR a ve srovnání s bromokriptinem a cabergolidem bez afinity k D1DR (156, 158). Výhodou tohoto léčiva je minimum vedlejších účinků díky D2DR selektivitě, v České republice se však rutinně nepoužívá.

#### **4.7.4. Obecné signalizační mechanismy a efektorové dráhy D2 dopaminového receptoru**

Hlavní signalizační aktivita DR je  $G\alpha$  dependentní: po vazbě receptorového ligandu dochází k aktivaci heterotrimerického G-proteinu, disociaci  $G\alpha$  podjednotky a k zahájení vlastního procesu signalizace (90). DR se funkčně a historicky dělí do dvou skupin označovaných jako D1-like, zahrnující D1 a D5 receptor a D2-like, zahrnující D2, D3 a D4 receptor. D2-like receptory jsou asociovány s  $G\alpha_{i/o}$  proteiny, jejichž aktivace má inhibiční účinky na adenylátcyklázu, vede k poklesu koncentrace cAMP v buňce a k inhibici protein kinázy A (PKA)(151, 159). Jedním z cílů aktivované signalizační kaskády cAMP je mimo jiné Pit1 zodpovědný za koaktivaci transkripce STH a prolaktinu(152). Dopaminová signalizace prostřednictvím D2DR tedy vede k poklesu hladiny intracelulárních druhých posílů (cAMP a též  $Ca^{2+}$ ) a následné inhibici sekrece prolaktinu (151, 155, 159). Dále signalizační dráhy D2DR interagují se signalizačními drahami MAPK a Akt. Mechanismy D2DR signalizace jsou tedy komplexní a zahrnují různé intracelulární signalizační kaskády, jejichž aktivace vede k inhibici sekreční a proliferační aktivity laktotropních buněk hypofýzy. Většina výše citovaných pramenů se zabývala laktotropními buňkami a tyto poznatky tedy mohou mít omezený význam v kontextu somatotropních tumorů. Vzhledem k inhibičním účinkům DA na sekreci a proliferaci somatotropních PitNETů in vivo (viz sekce 4.7.6) a vzhledem k liniové příbuznosti obou druhů buněk (viz sekce 4.0.2.3 a 4.2.1) však lze předpokládat určitou extrapolovatelnost výše uvedených údajů.

#### **4.7.5 Intracelulární kinetika D2DR receptoru**

Biologicky aktivní forma D2DR je lokalizována na buněčné membráně (151, 160). Obdobně jako u jiných receptorů spojených s G-proteinem dochází po aktivaci D2DR ke zpětnovazební inhibici signalizace a internalizaci receptoru procesem endocytózy. V závislosti na buněčném kontextu může docházet po disociaci dopaminu zpět k recyklaci receptoru na membránu anebo k destrukci v lysozomech. V některých experimentech detekujících D2DR



prostřednictvím imunofluorescence a imunohistochemie byla pozorována výrazná cytosolická akumulace receptoru převažující kvantitativně nad membránovou lokalizací. Tento fenomén je vysvětlován akumulací nově syntetizovaných receptorů v endoplasmatickém retikulu, pouze s malým podílem akumulace receptorů internalizovaných z buněčné membrány (161-163). D2DR může na buněčné membráně vytvářet heterodimery či heterooligomery s dalšími receptory spojenými s G proteinem, s obdobnými následky jako bylo popsáno v sekci 4.6.5. V literatuře byla popsána vlastní homodimerizace D2DR a dále heterodimerizace D2DR a SSTR2 a též D2DR a SSTR5, jež modifikovala signalizační funkce a kinetiku obou receptorů (152, 164).

#### **4.7.6 Exprese a fyziologický význam dopaminové signalizace v normálních somatotropních a laktotropních buňkách**

Nejčastěji exprimovaným subtypem DR na úrovni mRNA je v normální hypofýze D2DR. Exprese dalších DR subtypů byla v normální hypofyzární tkáni též detekovatelná (130, 132). V hypofýzách byly identifikovány obě isoformy (D2S a D2L), přičemž exprese D2S byla ve srovnání s D2L vyšší (132) oproti dřívějším studiím, které naopak popisovaly převahu exprese D2L isoformy (132, 155). D2DR je v současnosti považován za funkčně nejdůležitější signalizační prvek hypotalamohypofyzárního dopaminergního systému (152, 153, 155, 165). Tento vliv je dobře charakterizován v laktotropních buňkách a v prolaktinomech, kdy inhibice hladin intracelulárního kalcia a hyperpolarizace membrány blokuje konstitutivně aktivní sekreci laktotropních buněk (153, 155, 165). Prostřednictvím D2DR exprimovaného v somatotropních buňkách vedla in vitro stimulace dopaminem také k poklesu sekrece STH. In vivo stimulace D2DR naopak vedla ke zvýšené sekreci STH, zprostředkované nejspíše účinky na hypotalamické neurony exprimující D2DR (165).

#### **4.7.7 Exprese D2DR v somatotropních PitNETech**

Exprese dopaminových receptorů v buňkách somatotropních PitNETů byla opakovaně studována různými přístupy zahrnujícími imunohistochemii a metody molekulárně genetické (in situ hybridizace, RT-qPCR). Množství dat o expresi D2DR v somatotropních tumorech je však menší ve srovnání s údaji o laktotropních tumorech. Přehled studií zabývajících se expresí D2DR v somatotropních PitNETech je uveden v tabulce 4.12.

Tabulka 4.12 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí D2DR v somatotropních tumorech

Metodika	Celkový počet pacientů	Výsledek, komentář	Studie
RT-qPCR	39	Expresse ve 100 % tumorů s převahou D2S, nižší exprese ve srovnání s normální hypofýzou.	(132)
RT-qPCR	74	Nejvyšší exprese D2DR ve srovnání s ostatními DR, nižší exprese D2DR ve srovnání s normální hypofýzou, pozitivní korelace mezi expresí D2DR a SSTR1.	(130)
RT-qPCR	25	Expresse v 64 % tumorů, vyšší exprese u nádorů s koexpresí SSTR5. Absence exprese v 28 % tumorů s koexpresí prolaktinu	(166)
ISH	25	Expresse v 92 % tumorů, z toho ve všech tumorech s koexpresí prolaktinu	(167)
IHC	84	Expresse v 98 % tumorů, bez vztahu ke klinickým vlastnostem anebo expresi SSTR2	(136)
IHC	24	Expresse v 92 % tumorů, bez vztahu s koexpresí prolaktinu	(140)
IHC	20	Expresse v 100 % tumorů	(168)
IHC	7	Expresse v 71 % tumorů	(169)

Z výše zmíněných údajů vyplývá, že exprese D2DR v somatotropních PitNETech je častá (64-100 % případů), avšak kvantitativně nižší ve srovnání s tkání normální hypofýzy, která obsahuje laktotropní buňky. Samotná exprese D2DR není v tumorech nutně spojená s koexpresí prolaktinu, což bylo prokázáno jak na úrovni mRNA, tak imunohistochemicky. Podíl odlišných sestřihových isoformů byly detekovány pouze v jedné studii s výslednou převahou D2S isoformy (cca 70 % transkriptů) nad D2L isoformou(132). Většina imunohistochemických studií využívala protilátky proti oběma isoformám, některé studie tento údaj u použité protilátky neuváděly. Imunohistochemická pozitivita v uvedených studiích vykazovala cytoplasmatickou, membránovou a ojediněle též jadernou lokalizaci(136, 140, 167, 169). Žádná ze studií nekorelovala množství mRNA a výsledek imunohistochemické detekce D2DR: ze studií zabývajících se jinými tumory je však zřejmé, že kvantitativní stanovení oběma metodami spolu nemusí korelovat(170).

#### 4.7.8 Klinické aspekty léčby DA u somatotropních PitNETů a klinický význam resistance na léčbu DA

##### 4.7.8.1 Klinická odpověď somatotropních tumorů na léčbu DA.

Studií zabývajících se léčbou somatotropních PitNETů DA je relativně málo(142, 171).

Většina dostupných studií se zabývala především biochemickou odpovědí na léčbu, zatímco

pouze několik málo prací se snažilo zhodnotit též redukci objemu tumoru(171, 172). Výsledky dostupných studií jsou obecně limitovány preferenčním terapeutickým použitím SSA, retrospektivní designem, metodickou variabilitou a rozdílnostmi ve složení kohort stran předchozího chirurgického zákroku(171-173). Množství pacientů, kteří dosáhli při monoterapii normalizace hladiny IGF1 se ve většině prací pohybovalo mezi 25-53 %. (173-175). Relativně velké procento (70–90 %) pacientů však pocítuje při terapii DA subjektivní zlepšení klinických příznaků.

#### *4.7.8.2 Klinická odpověď somatotropních tumorů na léčbu kombinací SSA a DA.*

Menší část studií se zabývala klinickými účinky kombinace SSA a DA. Podle většiny analyzovaných studií mělo podání obou přípravků pozitivní synergický terapeutický efekt, ačkoliv existují práce, které nepozorovaly výraznější rozdíly(172, 173, 175, 176).

Terapeutická odpověď v podobě normalizace hladin IGF1 se u pacientů léčených dvojterapií pohybovala mezi 42-52 %(177). Britský registr pacientů s akromegalií zahrnující 546 pacientů léčených kombinací naopak uváděl normalizaci hladin IGF1 pouze u 29-34 % případů ve srovnání s 41-50 % případů léčených pouze SSA (n=1702) a 25-26 % případů léčených pouze DA (n=1140)(175). Tato data však mohou být ovlivněna klinickou volbou kombinační terapie u pacientů primárně resistantních na předchozí monoterapii a samotným retrospektivním designem studie.

#### *4.7.8.3 Prediktory odpovědi na léčbu DA a jejich význam*

V kontextu somatotropních PitNETů byl jako nejčastější prediktor odpovědi na léčbu DA studován význam exprese prolaktinu v tumorech a hladina prolaktinémie. V metaanalýze 150 pacientů byla přítomná signifikantní korelace mezi hladinou sérového prolaktinu a odpovědí na léčbu hodnocenou standardizací IGF1, imunohistochemický průkaz prolaktinu v tumorech však s odpovědí jednoznačně nesouvisel(173). Obdobně prokázala vyšší účinnost léčby u pacientů se současnou sekrecí prolaktinu i další studie.(174). Jiné studie naopak nepozorovaly rozdíl mezi pacienty s tumory produkujícími pouze STH a s tumory se současnou produkcí prolaktinu(65, 140, 176, 178). Obecně lze tedy říci, že přestože je koprodukce prolaktinu často považována za pozitivní prediktivní faktor pro léčbu DA, nepředstavuje absence koprodukce prolaktinu negativní prediktivní faktor pro terapii DA: samotná prediktivní hodnota produkce prolaktinu je tedy v současné době značně omezená a kontroverzní. Vztah imunohistochemické koexprese prolaktinu ve tkáni tumoru v porovnání s hyperprolaktinemií a odpovědí na léčbu DA nebyl blíže studován.

#### *4.7.8.4 Klinický význam resistance na léčbu DA u somatotropních tumorů*

Klinický význam predikce odpovědi na DA je méně významný v porovnání s predikcí odpovědi na SSA. Roli v tomto ohledu hraje jednak poměrně nízká cena léčiva ve srovnání s SSA a dále dobrá tolerance novějších DA (cabergolin, quinagolid) pacienty(173). DA jsou lékem první volby, současně s očekávanou nižší účinností ve srovnání s SSA (viz sekce 4.7.8.1). Absence léčebné odpovědi při monoterapii nepředstavuje tudíž z ekonomického a terapeutického hlediska tolik závažný jev ve srovnání s absencí odpovědi na léčbu SSA. Z těchto důvodů nebyla problematika predikce odpovědi na DA u somatotropních PitNETů zevrubněji zkoumána, na rozdíl od laktotropních tumorů, kde DA představují nejvýznamnější terapeutickou modalitu.

#### **4.7.9 Potenciální mechanismy resistance na léčbu DA v somatotropních PitNETech**

Obdobně jako u SSSTR přichází teoreticky do úvahy několik mechanismů, jež se mohou na resistenci podílet: inaktivační mutace genu pro D2DR, porucha mechanismů signálních kaskád zprostředkovaných D2DR signalizací a variabilní exprese D2DR v tumorech. Inaktivační mutace genu pro D2DR nebyly v několika studiích prokázány ani ve skupině DA resistantních prolaktinomů, ani ve skupině prolaktinomů odpovídající na léčbu. Resistance k DA korelovala s přítomností běžného genového polymorfismu zahrnujícího C→T substituci na pozici 957. Ta vedla k nižší stabilitě mRNA(147). U některých DA resistantních prolaktinomů byla popsána redukováná exprese  $G\alpha_i$  proteinu zodpovědného za D2DR signalizaci a dále byla popsána snížená aktivita signální dráhy TGF $\beta$ /SMAD. Byly též identifikovány některé miRNA, diferencially exprimované v resistantních a senzitivních prolaktinomech, které inhibovaly expresi tumor-supresorových proteinů interagujících s buněčným cyklem (p21)(147). Tyto mechanismy byly studovány především v prolaktinomech, u kterých patří DA k lékům první volby. Data týkající se somatotropních tumorů chybí a vzhledem k důvodům popsaným v 4.7.8 nelze v dohledné době očekávat nové studie týkající se této problematiky. Diferenciální exprese D2DR v somatotropních tumorech a její prediktivní význam je diskutován v sekci 4.7.10.

#### **4.7.10 Prediktivní význam exprese D2DR v somatotropních PitNETech.**

Expresa D2DR podmiňuje farmakologickou odpověď na DA(153, 171). V kontextu somatotropních PitNETů však nebyl prediktivní vliv exprese D2DR na odpověď na léčbu DA extenzivněji studován, především z důvodů diskutovaných v 4.7.8. Krátký přehled prací, jež

se touto problematikou zabývaly, včetně prací zabývajících se vlivem exprese D2DR na odpověď na SSA je uveden v tabulce 4.13.

Tabulka 4.13 – Přehled studií zabývajících se prediktivním významem D2DR v somatotropních tumorech

Způsob hodnocení exprese D2DR	Počet pacientů	Způsob hodnocení klinické odpovědi	Klinická odpověď	Citace
IHC	24	Pokles IGF1 in vivo, potlačení sekrece STH in vitro	Suprese sekrece STH in vitro po podání quinagolidu u tumorů s vyšší expresí D2DR. Bez korelace mezi expresí D2DR a odpovědí na DA v in vivo studii. Lepší odpověď na oktreotid u tumorů s expresí D2DR.	(140)
RT-qPCR	25	Potlačení sekrece STH in vitro	Vyšší pokles sekrece STH po podání SSTR2 agonisty u tumorů s expresí D2DR, nižší pokles sekrece STH po podání SSTR5 agonisty u tumorů s expresí D2DR.	(166)
IHC	66	Pokles IGF1	Bez vlivu exprese D2DR na odpověď na SSA první generace.	(136)
RT-qPCR	58	Pokles IGF1 (3 a 6 měsíců)	Bez vlivu exprese D2DR na odpověď na SSA první generace.	(130)
RT-qPCR	39	Pokles STH a IGF1 (3 a 6 měsíců)	Bez vlivu exprese D2DR na odpověď na SSA první generace.	(132)

Na podkladě výše uvedeného lze zkonstatovat, že i přes výsledky in vitro studií nemá nejspíše v in vivo podmínkách případná dimerizace D2DR a SSTR2/5 vliv na terapeutickou odpověď na SSA. Ačkoliv experimentální data týkající se odpovědi na DA a exprese D2DR v somatotropních PitNETech chybí, z údajů v sekcích 4.7.7 a 4.7.8.1 vyplývá, že D2DR je v somatotropních tumorech ubikvitně exprimován a ve srovnání s dalšími dopaminovými receptory je kvantita jeho exprese nejvyšší. Odpověď na monoterapii DA je však poměrně nízká (cca 30-50 %), než by bylo možné očekávat z údajů o expresi; tato data, spolu s údaji o diskordanci mezi D2DR expresí a in vivo reakcí na DA v jedné z výše uvedených studií, podporují hypotézu, že samotné kvantitativní stanovení exprese D2DR nemá pro predikci in vivo odpovědi význam. Důvody těchto nálezů ani opakovaně zaznamenaná diskordance mezi výsledky in vitro a in vivo studií nejsou v současné době blíže prostudovány. V jedné ze studií (n=58) korelovala exprese mRNA D4DR a D5DR s laboratorní odpovědí na léčbu SSA(130). Nelze tedy vyloučit, že se na rozporuplných výsledcích podílí i jiné druhy dopaminových receptorů, a to i přes výrazně nižší kvantitu exprese ve srovnání s D2DR.

#### 4.7.11 Závěr

D2 dopaminový receptor je nejčastěji a nejvíce exprimovaný dopaminový receptor v somatotropních PitNETech. Farmakologická aktivita dopaminu a DA se přičítá D2DR inhibiční signalizaci prostřednictvím  $G_{\alpha_i}$  proteinu a jeho vlivu na sekreci a proliferaci nádorových buněk. Samotná účinnost DA v léčbě somatotropních PitNETů je poměrně nízká (cca 30-50 %), přičemž klinické a laboratorní možnosti predikce odpovědi jsou limitované a vliv koexprese prolaktinu nebyl v tomto ohledu jednoznačně potvrzen. Vzhledem k významnější roli SSA v léčbě akromegalie nebyla prediktivní hodnota exprese D2DR extenzivněji studována. I když existují vícečetné experimentální důkazy o interakci D2DR a SSSTR in vitro, v několika in vivo studiích s relativně velkým množstvím pacientů nebyl tento fenomén empiricky zaznamenán.

### 4.8 Prognostický význam exprese E-cadherinu v somatotropních PitNETech a prediktivní význam stran odpovědi na léčbu SSA

#### 4.8.1 Struktura a funkce E-cadherinu a vybraných asociovaných proteinů

##### 4.8.1.1 Struktura E-cadherinu

E-cadherin je transmembránový adhezivní glykoprotein exprimovaný v epiteliálních tkáních, který hraje komplexní úlohu v embryogenezi, kohezivitě a strukturálním uspořádání tkání, intracelulární buněčné signalizaci a onkogenezi epiteliálních tumorů. E-cadherin náleží do proteinové rodiny cadherinů, což jsou transmembránové glykoproteiny, k jejichž adhezivní funkci je nutná vazba s kalciovým kationtem. Protein má velikost 120 kDA, tvoří jej 728 aminokyselin a je kódován genem *CDH1* na dlouhé raménku chromozomu 16 v oblasti q22.1. Gen je lokalizován v rozsahu 100 kbp a obsahuje celkem 16 exonů. Promotorová oblast genu je bohatá na guanin a cytosin (CpG ostrůvky), což umožňuje epigenetickou regulaci exprese prostřednictvím metylace. E-cadherin má cytosolickou doménu s C-koncem peptidu, transmembránovou doménu a celkem pět extracelulárních domén zakončených N-koncem peptidu a zodpovědných za adhezivní funkci (179, 180).

##### 4.8.1.2 Struktura a funkční význam extracelulárních domén E-cadherinu

Extracelulární domény E-cadherinu jsou označovány EC1-EC5 a jsou tvořeny peptidem o délce 551 aminokyselin. Dvě molekuly E-cadherinu na povrchu jedné buňky utváří prostřednictvím interakce mezi extracelulárními doménami homodimery. Vlastní homodimerní forma je zodpovědná za vazbu s homodimery E-cadherinu sousedních buněk (homofilní interakce) za přítomnosti  $Ca^{2+}$ . Zatímco domény EC1 a EC2 poblíž N-konce peptidu jsou více zodpovědné za selektivitu vazebné interakce, EC3 zajišťuje pevnost vlastní

vazby(180). V literatuře je dále popsána heterofilní interakce s některými proteiny ze skupiny integrinů. Adhezivní funkce extracelulárních domén je zodpovědná za strukturu tkání, během embryogeneze se podílí na selektivní adhezi buněk jednotlivých zárodečných tkání a může buňce sloužit jako mechanoreceptor prostřednictvím interakce s aktin vážícími proteiny vinculinem a  $\beta$ -cateninem. (179-181). Extracelulární domény mohou být proteolyticky odštěpeny v oblasti mezi EC5 a transmembránovou doménou prostřednictvím různých proteáz z rodiny matrixových metaloproteináz (MMP) a ADAM (a disintegrin and metaloproteinase) metaloproteináz: následně vzniká solubilní 80 kDA fragment s autokrinní a parakrinní signalizační aktivitou. Solubilní extracelulární doména může svou vazbou na EGFR vést k dimerizaci a aktivaci receptoru, dále stimuluje v buňkách sekreci MMP a současně následkem štěpení dochází k poklesu adhezivity mezi buňkami. Tyto procesy se mohou podílet na zvýšené motilitě a invazivitě nádorových buněk během kancerogeneze (182).

#### *4.8.1.3 Struktura a funkční význam intracelulární domény E-cadherinu a s ní asociovaných proteinů*

Intracelulární doména E-cadherinu je tvořena 151 aminokyselinami. Doména má tři hlavní funkce: 1) je zodpovědná za vazbu proteinu na aktinová mikrofilamenta a mikrotubuly cytoskeletu, čímž reguluje buněčnou adhezivitu a mechanické vlastnosti buněk, 2) je zodpovědná za intracelulární distribuci E-cadherinu, 3) je zodpovědná za intracelulární signalizační aktivitu E-cadherinu. Vazba na aktinová mikrofilamenta je zprostředkována proteiny z rodiny cateninů:  $\alpha$ -cateninem a  $\beta$ -cateninem(180, 183). Navázaný  $\beta$ -catenin dále zabraňuje předčasné degradaci E-cadherinu proteasomy (183). Vazba intracelulární domény s p120 proteinem stabilizuje E-cadherin na membráně a brání jeho endocytóze, čímž přímo reguluje množství a lokalizaci E-cadherinu na buněčné membráně(184). Oba výše uvedené proteiny (p120 protein a  $\beta$ -catenin) zprostředkovávají intracelulární signalizační aktivitu E-cadherinu: proteiny fungují jako transkripční faktory a vazba na E-cadherin lokalizovaný v buněčné membráně zabraňuje jejich přesunu do jádra a biologické aktivaci (179-183). Vzájemná vazebná afinita celého komplexu E-cadherinu, p120 proteinu a  $\beta$ -cateninu může být pozitivně i negativně modifikována fosforylací serinových a threoninových reziduí těchto proteinů, která dále modifikuje ovlivňuje intracelulární lokalizaci, signalizační aktivitu a mechanicko-adhezivní funkci celého komplexu (180, 184). Kromě toho hraje v buněčné signalizaci roli též proteolytické štěpení E-cadherinu. V intracelulární části proteinu existují dvě štěpná místa. První se nalézá na rozhraní transmembránové a cytoplasmatické domény, kde

aktivitou enzymu  $\gamma$ -sekretáza (presenilin-1/2) dochází k odštěpení 33kDA fragmentu označovaného E-cad/CTF2. Tento fragment může být dále rozštěpen kaspázou-3 ve druhém štěpném místě na 29kDA fragment označovaný E-cad/CTF3. K odštěpení E-cad/CTF2 dochází obvykle po předchozím proteolytickém oddělení extracelulární domény (viz sekce 4.8.1.2) (182). Po odštěpení E-cad/CTF2 fragmentu od transmembránového residua dochází k uvolnění p120 proteinu a  $\beta$ -cateninu do jádra buňky; E-cad/CTF2 fragment může i po přesunu do jádra zůstat navázaný na p120 protein a zvyšovat dále jeho aktivitu(182).

#### **4.8.2 Exprese E-cadherinu v buňkách normální hypofýzy**

Exprese E-cadherinu byla opakovaně detekována na úrovni mRNA a imunohistochemicky v buňkách normální hypofýzy, což odráží jejich epiteliální charakteristiky (viz sekce 4.1.3)(145, 185-188). Zatímco v některých studiích vykazovala výrazná většina buněk normální hypofýzy silnou membránovou pozitivitu (185, 187, 188), v jiných studiích byla patrná mozaikovitá exprese se silnou expresí pouze v části buněk(145, 186). Z těchto studií se expresním profilem cadherinů v normální hypofýze zabývala detailněji pouze jedna: z 21 různých cadherinů byla v normální hypofýze exprimována pouze mRNA E-cadherinu, N-cadherinu, CDH5 a CDH18. Exprese E-cadherinu a CDH18 byla přítomná v normálních somatotropních a laktotropních buňkách, zatímco ve zbývajících buněčných podtypech převládala exprese N-cadherinu a exprese E-cadherinu byla nízká anebo zcela chyběla(186). Diskrepanci mezi nálezy lze nejspíše interpretovat na podkladě metodických rozdílů uvedených studií (použití fluorescenční konfokální mikroskopie v (186)) a odlišné citlivosti imunohistochemických reakcí. Imunohistochemicky stanovená exprese E-cadherinu v normální hypofyzární tkáni byla vyšší ve srovnání s expresí v nádorech(185), exprese hodnocená pomocí RT-qPCR však byla srovnatelná(185, 189).

#### **4.8.3 Exprese E-cadherinu a asociovaných proteinů v somatotropních tumorech hypofýzy a jejich význam**

Vzhledem k dobře definovanému významu exprese E-cadherinu v kontextu nádorové biologie byla exprese tohoto proteinu studována opakovaně též v somatotropních PitNETech a to jak molekulárně biologickými metodami (RT-qPCR), tak metodami proteomickými (western blot, imunohistochemie). Exprese byla korelována s různými klinickými parametry a v několika studiích též s odpovědí na léčbu SSA.

*4.8.3.1 Exprese E-cadherinu v jednotlivých subtypech somatotropních tumorů hypofýzy a její klinický a prognostický význam*



Expresí E-cadherinu ve vztahu k dalším klinickým, patologickým a prognostickým faktorům tumorů se zabývaly opakované studie. Jejich výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.14. Bližší rozbor si zaslouhuje studie 83 případů, která porovnávala expresi E-cadherinu western blotem a dále imunohistochemicky pomocí dvou protilátek cílených proti intracelulární a extracelulární doméně proteinu. Zatímco průkaz extracelulární domény E-cadherinu byl slabý anebo zcela negativní v 21 případech (25 %), protilátka proti intracelulární doméně identifikovala přítomnost E-cadherinu ve všech tumorech a současně identifikovala jadernou lokalizaci E-cadherinu v 9 případech (11 %): nádory s jadernou pozitivitou byly negativní v průkazu extracelulární domény a jevíly negativní anebo oslabenou membránovou pozitivitu při průkazu intracelulární domény (62, 146). Údaje v tabulce 4.15 ilustrují silnou asociaci mezi nízkou expresí E-cadherinu a SGST subtypem, a tento vztah blíže podporuje též negativní asociace exprese E-cadherinu s expresí SSTR5(145) a naopak vyšší exprese SSTR2 u nádorů s vyšší expresí E-cadherinu (146). V souladu s tímto nálezem je i častá asociace nízké exprese E-cadherinu s větší velikostí a invazivitou tumoru. Dvě studie dále demonstrovaly jadernou pozitivitu nádorů při průkazu E-cadherinu protilátkou proti intracelulární doméně proteinu(146, 185). Na podkladě údajů citovaných v sekci 4.8.1.3 a experimentálně blíže verifikovaných např. v (190-192) je autor této práce přesvědčen, že se pravděpodobněji jedná o skutečný biologický fenomén nežli o laboratorní artefakt.

Tabulka 4.14 – Přehled studií zabývajících se expresí E-cadherinu v somatotropních PitNETech

Metodika	Celkový počet pacientů	Výsledek, komentář	Studie
IHC	62	Redukovaná exprese ve skupině SGST, exprese nekorelovala s biochemickým nálezem, velikostí ani invazivitou.	(187)
IHC	37	Negativní korelace mezi množstvím fibrózních tělísek a expresí E-cadherinu. Exprese nekorelovala s biochemickým nálezem ani velikostí.	(68)
IHC	104	Signifikantně nižší exprese v SGST oproti DGST.	(22)
IHC	141	Signifikantně nižší exprese v SGST oproti DGST.	(24)
IHC	33	Signifikantně nižší exprese v SGST oproti DGST.	(133)
IHC	35	Signifikantně nižší exprese v tumorech s radiologickou invazí a v recidivujících tumorech.	(193)
IHC	10	Exprese v 60 % tumorů při stanovení protilátkou proti extracelulární doméně. Exprese ve 100 % tumorů při stanovení protilátkou proti intracelulární doméně s jadernou expresí. Pozitivní korelace jaderné positivity s invazivitou a Ki67.	(185)
RT-qPCR	27	Signifikantně nižší exprese ve skupině radiologicky invazivních tumorů. Nízká exprese mRNA korelovala s absencí membránové lokalizace proteinu při imunoflorescenci	(186)
RT-qPCR	20	Exprese mRNA nekorelovala s velikostí či invazivitou.	(189)
IHC	55	Exprese v 49 % tumorů, negativní tumory signifikantně větší a častěji radiologicky invazivní. Signifikantně nižší exprese v SGST oproti DGST. Negativní korelace mezi expresí SSTR5 a E-cadherinu.	(145)
IHC	24	Signifikantně nižší exprese v SGST oproti DGST.	(188)
Western blot a IHC	83	Pozitivní korelace s expresí SSTR2. Signifikantně nižší exprese v SGST oproti DGST. Negativní korelace exprese s velikostí a invazivitou. Bližší komentář viz text.	(62, 146)

#### 4.8.3.2 Analýza metodických aspektů stanovení exprese E-cadherinu

Studie analyzované v sekci 4.8.3.1 se lišily samotnými analytickými metodami (RT-qPCR, western blot, imunohistochemie) a v případě imunohistochemie též použitými protilátkami a metodikou hodnocení. Některé z imunohistochemických studií se snažily o exaktní procentuální kvantifikaci E-cadherin pozitivních buněk(24, 68), většina však využívala semikvantitativní přístup s rozdělením tumorů do několika (většinou 3-4) variabilně definovaných skupin, obvykle na podkladě množství pozitivních buněk a někdy též intenzity imunohistochemické reakce(22, 62, 145, 146, 187, 193). Nízká exprese mRNA E-cadherinu

stanovená pomocí RT-qPCR korespondovala v jedné ze studií s nízkou imunofluorescenční hladinou proteinu(186), v jiné studii (zahrnující i nesomatotropní tumory) byla imunohistochemická exprese E-cadherinu identifikovatelná ve všech tumorech, obdobně jako exprese mRNA, s výjimkou jednoho z případů (185). Korelaci mezi imunohistochemií a western blotem se zabývala jediná studie: z výsledků byla patrná statisticky signifikantní korelace obou metod i při použití odlišných protilátek proti extracelulární a intracelulární doméně E-cadherinu: výsledky získané použitím obou protilátek vykazovaly též vzájemnou výraznou a statisticky signifikantní korelaci (146).

#### *4.8.3.3 Prediktivní význam exprese E-cadherinu pro odpověď na léčbu SSA*

Pouze dvě studie se zabývaly významem exprese E-cadherinu v predikci odpovědi na léčbu SSA. Ve studii zahrnující 83 případů byla patrná korelace mezi expresí E-cadherinu (western blot, protilátky proti extracelulární i intracelulární části proteinu) a redukcí hladiny STH při akutním oktreotidovém testu provedeném u 48 pacientů. Pokles hladiny IGF1 po léčbě SSA (medián 6 měsíců) koreloval negativně pouze s jadernou pozitivitou E-cadherinu (reálně tedy negativní membránovou pozitivitou u části tumorů) a obdobně byl přítomna signifikantní negativní asociace mezi jadernou expresí E-cadherinu a redukcí objemu tumoru. Výsledky byly limitovány dostupností údajů o odpovědi na léčbu pouze na menším podsouboru pacientů s předoperační léčbou SSA (n=23, z toho jen 3 nádory s jadernou pozitivitou)(62, 146). Druhá studie hodnotila léčebnou odpověď na SSA u 55 pacientů: i přes použití totožné protilátky (viz sekce 4.8.3.4) nebyla zaznamenána jaderná exprese ani v jednom z tumorů. Exprese E-cadherinu signifikantně korelovala s redukcí hladiny IGF ve 3. měsíci (n=41) i v 6. měsíci po léčbě (n=36) a pouze 6 % pacientů (1/17) bez exprese E-cadherinu vykazovalo v 6. měsíci biochemickou odpověď na léčbu SSA(145).

Interpretace příčin těchto nálezů poukazuje dle autora na význam, který hraje patologický subtyp tumoru: v první studii (62, 146) korespondovala nízká membránová či jaderná exprese E-cadherinu se skupinou SGST a exprese E-cadherinu též pozitivně korelovala s expresí SSTR2. Je tedy pravděpodobné, že prediktivní hodnota E-cadherinu zde odráží pouze klinický fenotyp SGST charakteristický nízkou expresí SSTR2 (viz sekce 4.6.7.3) a horší klinickou odpovědí na léčbu SSA. Obdobná je interpretace výsledků druhé studie (145), kde nebyla sice přítomná signifikantní korelace mezi hladinou E-cadherinu a SSTR2, většinu tumorů negativních v průkazu E-cadherinu však opět představovaly SGST, což vysvětluje i popsanou negativní korelaci mezi hladinou E-cadherinu a SSTR5 (vyšší exprese SSTR5 bývá opět

popisována u SGST – viz 4.6.7.6). Nezávislý prediktivní význam exprese E-cadherinu stran odpovědi na léčbu SSA tedy vyžaduje další bližší zkoumání.

#### **4.8.4 Mechanismy snížené exprese E-cadherinu v somatotropních PitNETech**

Snížená anebo chybějící exprese E-cadherinu v tumorech může mít příčiny na genetické anebo epigenetické úrovni. Přestože mutace v genu *CDH1* jsou časté u některých nádorových onemocnění (např. karcinomy prsu a žaludku), mutace *CDH1* nebyla zaznamenána v opakovaných genetických studiích somatotropních tumorů (52, 53, 185). Ve dvou studiích byla zaznamenána metylace promotoru genu *CDH1*: Ve skupině 16 SGST byl promotor metylován v 37,5 % (6/16) případů, metylace nebyla prokázána v žádném z 10 studovaných DGST(187). Ve druhé studii byla metylace promotoru přítomná v 21 % případů (5/24); studie blíže neanalyzovala jednotlivé subtypy somatotropních tumorů(188). Dalším možným mechanismem poklesu proteinové exprese je represe transkripčními faktory regulujícími proces epitelomesenchymální tranzice (viz sekce 4.8.1.6). Konečně může být celulární koncentrace proteinu regulována štěpením a variabilní fosforylací E-cadherinu a jeho asociovaných proteinů, jež řídí intracelulární distribuci a degradaci E-cadherinu (viz sekce 4.8.1.3). V tomto ohledu může existovat spojitost mezi signalizací zprostředkovanou SSTR2 a funkčním stavem E-cadherinu, neboť fosfatáza SHP1 aktivovaná prostřednictvím SSTR2 signalizace defosforyluje E-cadherin a může tak obnovovat jeho fyziologickou membránovou funkci(146).

#### **4.8.5 Závěr**

Z výše uvedených údajů vyplývá, že exprese E-cadherinu se liší v závislosti na histologickém subtypu: téměř všechny analyzované SGST vykazovaly ztrátu exprese anebo signifikantně nižší expresi ve srovnání s DGST tumory. Opakovaně nebyl zaznamenán vztah mezi expresí E-cadherinu a vstupní hladinou IGF1, STH, věkem pacientů či pohlavím. Nádory s nízkou expresí E-cadherinu byly v části studií větší a vykazovaly vyšší invazivitu ve srovnání s tumory s vysokou expresí, některé studie však nezaznamenaly v těchto parametrech statisticky signifikantní rozdíl. V některých studiích byla nízká exprese E-cadherinu dávána do souvislosti s resistencí na léčbu SSA, vzhledem k asociaci nízké exprese E-cadherinu s SGST a relativně malým množstvím pacientů ve studiích však nelze zcela spolehlivě určit, nakolik je exprese E-cadherinu nezávislou biologickou veličinou a nakolik ve studiích odráží pouze přítomnost SGST, které mají samy o sobě odlišné biologické a prognostické vlastnosti; žádná ze studií se separátně nezabývala biologickými vlastnostmi tumorů z DGST skupiny s nízkou expresí E-cadherinu, které se sice vyskytují, avšak vzácně. Detekce exprese pomocí

western blotu korelovala s imunohistochemickým stanovením. Různé protilátky poskytovaly odlišné údaje o expresi E-cadherinu, včetně detekce jaderné lokalizace proteinu; vzhledem k rozptylu výsledků získaných použitím shodné protilátky lze usuzovat na výrazný vliv konkrétní imunohistochemické metodiky na výsledek reakce.

#### **4.9 Prognostický význam exprese arylhydrokarbonreceptor-interagujícího proteinu (AIP) v somatotropních PitNETech a prediktivní význam stran odpovědi na léčbu SSA**

##### **4.9.1 Arylhydrokarbonreceptor-interagující protein (AIP), jeho struktura a význam v somatotropních tumorech.**

Arylhydrokarbonreceptor-interagující protein je chaperonový protein tvořený 330 aminokyselinami, o velikosti 38 kDA, kódovaný genem na lokusu 11q13.2 (194-196). Nízká exprese AIP, ať už na podkladě mutace anebo epigenetických změn, je považována za negativní prognostický a prediktivní faktor u somatotropních tumorů.

##### **4.9.2 Normální funkce AIP a interakce se signalizačními dráhami SSTR systému**

V komplexu s heatshock proteinem 90, heatshock proteinem 23 a proteinem Pp60<sup>src</sup> tvoří AIP chaperonový komplex stabilizující v cytoplasmě arylhydrokarbonreceptor (AHR), který funguje jako intracelulární receptor některých xenobiotik (197). AIP vazbou na AHR stabilizuje komplex proteinů v cytoplasmě, čímž brání jaderné translokaci a transkripční aktivaci AHR. AHR může mimo jiné přímo interagovat s buněčným cyklem a apoptózou a samotný AIP dále interaguje jako chaperonový protein s dalšími proteiny a s jejich buněčnými mechanismy; role AIP je tedy v buňce komplexní(198).

##### **4.9.3 Genetické faktory spojené s dysfunkcí AIP v somatotropních tumorech**

Monoalelická mutace *AIP* v zárodečné linii je genetickou příčinou syndromu izolovaných familiárních adenomů hypofýzy (FIPA, blíže viz sekce 4.4.2) v 15–20 % případů. Pacienti s mutací *AIP* vykazují resistenci na léčbu oktreotidem a lanreotidem(51). Ve většině případů postihuje mutace *AIP* oblast proteinu zodpovědnou za vazbu na AHR(198).

##### **4.9.4 Interakce AIP se signalizačními dráhami SSTR systému**

Vzhledem k charakteristické resistenci na SSA u pacientů s FIPA byla interakce AIP a signalizačního systému SSTR předmětem rozsáhlých studií, jež však dosud nevedly k plnému objasnění tohoto fenoménu. Několik navrhovaných mechanismů zahrnuje modulaci intracelulární hladiny cAMP prostřednictvím interakce AIP s fosfodiesterázou(198), dále interakci mezi AIP a proteinem ZAC1, který se podílí na tumorsupresní aktivitě SSTR

signalizace, anebo snížení hladiny  $G\alpha_i$  proteinu, který slouží jako převodník SSTR signalizace (viz sekce 4.6.4)(51, 199). Hlubší rozbor problematiky je nad rámce této práce.

#### **4.9.5 Význam exprese AIP ve somatotropních tumorech bez zárodečné mutace AIP**

##### *4.9.5.1 Prediktivní a prognostický význam exprese AIP v somatotropních tumorech*

Expresí AIP byla studována v několika studiích ve vztahu k prognostickým a prediktivním faktorům somatotropních tumorů. Přehled studií je v tabulce 4.15. Obecně lze říci, že ve většině dostupných prací nádory s nízkou expresí AIP vykazovaly častěji terapeutickou resistenci na léčbu SSA první generace. Část studií prokázala asociaci mezi nízkou hladinou AIP a prognostickými faktory jako je velikost, index Ki67 a invazivita tumorů, jiné studie naopak tento náález nepotvrdily. Dvě studie identifikovaly nižší expresi SSTR2 a SSTR3 u nádorů s nižší expresí AIP, zatímco hladiny SSTR5 nebyly signifikantně odlišné. Asociace mezi nízkou expresí AIP a SGST fenotypem byla popsána v jedné studii, další práce buďto nenalezly souvislost, anebo se touto problematikou blíže nezaobíraly.

##### *4.9.5.2 Metodické poznámky k hodnocení exprese AIP*

Expresí AIP byla v dostupných pracích studována molekulárně genetickými i proteomickými metodami jako je western blot anebo imunohistochemie. Výsledky PT-qPCR a imunohistochemie mezi sebou nekorespondovaly: expresí mRNA byla v jedné z dostupných studií relativně konstantní napříč kohortou případů, zatímco imunohistochemická expresí se mezi jednotlivými případy relativně lišila. Autoři interpretovali tento fenomén jako následek možných posttranskripčních a posttranslačních modifikací ovlivňujících životnost proteinu v buňce(200). Většina citovaných studií stanovovala expresí pomocí imunohistochemie, s použitím totožné monoklonální protilátky 35-2(148, 199, 201, 202). Expresí byla v některých studiích (148, 202) hodnocena pomocí H-skóre, totožnou metodikou popsanou v sekci 4.4 této práce. Zbývající studie zvolily jiné semikvantitativní hodnocení založené na interpretaci množství pozitivních buněk a intenzity imunohistochemické reakce(199, 201, 203). Studie využívající western blot nekorelovala výsledky s jinou metodikou(133). Expresí AIP bylo možné identifikovat v naprosté většině zkoumaných tumorů bez identifikované zárodečné mutace.

Tabulka 4.15 – Přehled studií zabývajících se expresí AIP v somatotropních PitNETech

Metodika	Celkový počet pacientů	Výsledek, komentář	Studie
IHC	62	Negativní asociace exprese s velikostí, invazivitou a Ki67. Vyšší exprese u pacientů s dobrou reakcí na léčbu SSA v podobě biochemické odpovědi a redukce objemu tumoru.	(199)
IHC	60	Signifikantně nižší exprese AIP ve skupině pacientů se špatnou biochemickou odpovědí na léčbu SSA. Exprese nekorelovala s velikostí a proliferační aktivitou nádorů, korelovala však pozitivně s expresí SSTR2 a SSTR3.	(202)
IHC	35	Signifikantně nižší exprese AIP ve skupině pacientů se špatnou biochemickou odpovědí na léčbu SSA.	(203)
IHC	39	Signifikantně nižší exprese AIP ve skupině pacientů se špatnou biochemickou odpovědí na léčbu SSA první generace. Exprese pozitivně korelovala s expresí SSTR2 a SSTR3, nikoliv však SSTR5. Exprese nekorelovala s velikostí a invazivitou tumoru.	(148)
IHC	51	Nižší exprese asociovaná s větší velikostí a SGST subtypem. Odpověď na léčbu SSA bez asociace s expresí.	(201)
RT-qPCR, Western blot	33	Bez klinickopatologické korelace exprese.	(133)

#### 4.9.6 Závěr

Mutace v genu AIP je jednou z příčin hereditárních somatotropních PitNETů. Snížená exprese AIP ve sporadických tumorech představuje podle většiny dostupných studií negativní prediktivní faktor pro léčbu SSA první generace. Nízká exprese představuje nejspíše též nepříznivý prognostický faktor, výsledky studií jsou nicméně v tomto ohledu rozporuplné. Mechanismus, jímž se AIP podílí na klinickém fenotypu tumorů nebyl v současné době plně objasněn a existuje několik biologicky plausibilních variant, které mohou in vivo hrát roli.

## 5. Cíle disertační práce

Definující klinické charakteristiky (akromegalie) a patologické parametry (neuroendokrinní nádor z Pit1 linie s tvorbou STH) vymezují skupinu pituitárních neuroendokrinních tumorů (PitNETů), které jsou předmětem této studie. Na podkladě rozsáhlých literárních pramenů shrnutých v teoretické sekci této práce vyplývá, že se jedná o značně heterogenní skupinu nádorů, která se odlišuje po stránce genetické, imunohistochemické a též klinické.

Klinikopatologickou limitací diagnózy somatotropního PitNETu je omezená predikovatelnost biologického chování nádoru v čase a omezená predikovatelnost odpovědi na farmakologickou léčbu u tumorů, u kterých nebylo chirurgickou léčbou dosaženo remise onemocnění. Tato biologická nejistota a potřeba její redukce představuje hlavní cíl předkládané práce s významnými implikacemi pro klinický přístup k pacientům a ekonomické faktory léčby akromegalie.

Hlavním účelem této práce je tedy **identifikace prognostických faktorů a faktorů predikujících léčebnou odpověď na SSA u somatotropních PitNETů.**

Díličí cíle této práce, jsou následující:

- 1) Zevrubná klinicko-patologická charakteristika československého souboru pacientů s akromegalií zahrnutých mezi lety 2000 – 2015 do klinického registru RESET (REgistr SElárních Tumorů).
- 2) Posouzení exprese prolaktinu,  $\beta$ TSH, cytokeratinu 18 a jejich vztahu k ostatním biologickým a klinickým parametrům tumorů.
- 3) Posouzení přítomnosti standardně udávaných prognostických znaků (exprese p53, exprese Ki67 a mitotická aktivita), samostatně a též v kombinaci, a jejich vztahu k ostatním biologickým a klinickým parametrům tumorů.
- 4) Posouzení exprese jednotlivých farmakologických cílů somatostatinový analog (SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR5), farmakologického cíle dopaminových agonistů (D2DR) a jejich vztahu k ostatním biologickým a klinickým parametrům tumorů, včetně údajů o odpovědi na léčbu.
- 5) Posouzení exprese některých vybraných proteinů, které mohou ovlivňovat farmakologickou citlivost na somatostatinová analoga (E-cadherin, AIP) a jejich vztahu k ostatním biologickým a klinickým parametrům tumorů, včetně údajů o odpovědi na léčbu.



## **6. Materiál a metody**

### **6.1 Soubor pacientů**

#### **6.1.1 Registr RESET a klinické údaje získané z registru**

Všichni pacienti zařazení do studie byly osoby, jejichž údaje byly zpracovány a vyhodnoceny v registru RESET (registr sellárních nádorů, <http://reset.registry.cz/>) spravovaného Institutem biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity v Brně, Česká republika. Registr byl veden jako multicentrická platforma pro evidenci pacientů se sellárními tumory, na níž se podílela klinická centra napříč Českou a Slovenskou Republikou. Do registru byli zařazení muži a ženy diagnostikovaní a léčeni s akromegalií mezi roky 2000–2015 na území České a Slovenské republiky. Studie byla schválena Českou endokrinologickou společností a též etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kde byla provedena experimentální část studie. Údaje v registru byly vedeny ve formě data narození, pohlaví a iniciál. Zadávací klinická pracoviště poskytla do registru vstupní klinické a laboratorní parametry pacientů ve standardizované formě. Dále pracoviště poskytla do registru záznamy o průběhu vlastní terapie (operace, radioterapie, farmakoterapie SSA a DA) včetně údajů o délce trvání terapie a jejích výsledcích v podobě průběžných laboratorních parametrů. Většina klinických údajů pro účely této studie byla získána z údajů v registru. V některých případech, chyběla-li potřebná data, bylo kontaktováno zadávací pracoviště s žádostí o doplnění klinických údajů.

Vzhledem k designu studie (multicentrická retrospektivní studie) byly tedy klinické a laboratorní údaje použité ve studii s výjimkou údajů patologické analýzy (viz dále) získány na různých pracovištích různými laboratorními postupy. Pro účely této práce byly z registru použity následující klinické a laboratorní údaje: věk a pohlaví pacienta při diagnóze, vstupní sérová hladina STH, vstupní sérová hladina IGF1 ve formě násobku normy hladiny IGF1 pro daný věk pacienta, vstupní sérová hladina prolaktinu, vstupní sérová hladina  $\beta$ TSH, největší průměr tumoru dle MRI vyšetření v době diagnózy a objem tumoru v době diagnózy vypočítaný z dostupných radiologických dat vždy totožným způsobem. Vzhledem k inkompletním radiologickým údajům u části pacientů a vzhledem k charakteru radiologických záznamů v registru, které neumožňovaly objektivizaci nálezu nebyly údaje o invazi nádorů získány z registru, ale byly doplněny dodatečně po revizi snímků z magnetické rezonance. Údaje byly získány ve formě Knospovy klasifikace invaze sinus cavernosus. Pro účely práce byly následně nádory rozděleny na skupinu neinvazivních (Knospova klasifikace

invaze sinus cavernosus 0, 1 a 2) a invazivních (Knospova klasifikace invaze sinus cavernosus 3 a 4). Do studie byli zařazeni pacienti bez předchozí farmakologické léčby před vlastní operací i pacienti s předcházející farmakologickou léčbou: to bylo zohledněno v analýze dat.

Pro účely hodnocení výsledků léčby byly získány údaje o druhu použité léčby, délce trvání léčby a druhu, dávkování a délce farmakoterapie. Následně byl z celé skupiny vybrán podsoubor pacientů definovaných jako nemocní léčení operativně a současně farmakoterapeuticky somatostatinovými analogy, bez radioterapeutické intervence v analyzovaném časovém intervalu. Do skupiny byly zahrnuti také pacienti s kombinovanou léčbou SSA a dopaminovými analogy. Jako výstupní údaj o odpovědi na léčbu byly z registru získány poslední dostupné laboratorní hodnoty IGF1 v době terapie ve formě násobku normy hladiny IGF1 pro daný věk pacienta. Odpověď na léčbu byla hodnocena jako procentuální redukce násobku normy hladiny IGF1 v době mezi započatím léčby SSA a posledním dostupným vyšetřením během farmakoterapie. Pacienti byli následně rozděleni celkem do 4 skupin: pacienti s redukcí IGF1 <20 %, pacienti s redukcí IGF1 v rozmezí 20 – 50 %, pacienti s redukcí IGF1 v rozmezí > 50 % a pacienti s normalizací hladin IGF1. Doba mezi zahájením léčby SSA a posledním dostupným laboratorním vyšetřením u pacientů byla zaznamenána pro účely studie.

### **6.1.2 Vzorky tumorů použité ve studii**

Vlastní patologická studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové. Za účelem patologické analýzy na pracovišti autora (Fingerlandův ústav patologie – FÚP) byly zapůjčeny parafinové bloky se vzorky somatotropních nádorů od pacientů s akromegalií zařazených do registru RESET. Bloky byly získány jednak z archivu FÚP, dále z oddělení patologie Ústřední vojenské nemocnice v Praze, z Ústavu patologie Fakultní nemocnice v Brně, z Šiklova ústavu patologie Fakultní nemocnice v Plzni, z Ústavu patologie Univerzitní nemocnice L. Pasteura v Košicích a z oddělení patologie v Nemocnici Nové Zámky. V rámci studie byla oslovena další pracoviště patologie, jež však vzorky nádorů neposkytla. Nativní materiál tumorů byl na výše uvedených pracovištích fixován ve formaldehydu a následně zpracován standardní histologickou parafinovou technikou do podoby parafinových bločků. Materiál byl pro účely studie vyšetřen zaslepeně k původní histologické diagnóze.

## **6.2 Metodika morfologického vyšetření**

Parařinové bločky byly nakrářeny na řezy o tlouřtře 3 mm, řeř byly standardní automatizovanou procedurou obarveny hematoxylinem a eosinem. Výsledné řezy autor prohlédl na mikroskopu Nikon Eclipse E200. V řezu byla nejprve identifikována řítomnost tumoru. V řněkolika řípadech byl dodatečný tkářový řez totořné tlouřtřky (3 mm) impregnován stříbrem, metodou dle Gőmőriho, za účelem znázorněří retikulinových vláken pro lepší identifikaci vlastního tumoru. V řípadeř dostatečné velikosti tumoru byla spočítána mitotická aktivita v 10 polích velkého zvětření (400násobné zvětření - 1 pole o ploře 0,196 mm<sup>2</sup>). U nádorů od pacientů s farmakologickou léčbou řřed vlastní operací byl v tumoru zaznamenán stupeň změn způsobených léčbou SSA/DA (perivaskulární fibrotizace stromatu).

### **6.3 Imunohistochemické vyřetření tumorů**

V nádorech byla řzhodnocena řítomnost exprese vybraných proteinů prostřednictvím standardizované imunohistochemické reakce. Nejprve byly z bločku řzhotoveny řezy o tlouřtře 3 mm. Řezy byly odparařinovány, bylo provedeno demaskování epitopů, následně byly řezy inkubovány s primární protilátkou a poté byl použit detekční systém se sekundární protilátkou. Jako chromogen byl v reakci použit 3,3'-diamnobenzidin (DAB) a řezy byly následně dobarveny hematoxylinem. Výře popsáný proces byl proveden v automatizovaném systému Ventana Benchmark Ultra stainer od řirmy Roche (Tucson, AR, USA) anebo v automatizovaném systému Autostainer 48 od řirmy Agilent/Dako (Santa Clara, CA, USA). U systému Autostainer 48 byl pro demaskování epitopů použit řístroj PT-Link od téhoř výrobce. U systému Ventana Benchmark Ultra stainer byl pro demaskování epitopů použit roztok Cell Conditioning 1 (CC1) od řirmy Roche. Oba systémy vyuřívaly principu demaskování epitopů pomocí vysoké teploty (heat induced epitope retrieval, HIER) v řředdefinovaném pH. Jako detekční systém byly použity produkty Ventana ultraView a Ventana OptiView od řirmy Roche a EnVision Flex od řirmy DAKO. Doba a způsob demaskování epitopů, výrobce a klon primární protilátky, použitá koncentrace protilátky, délka inkubace protilátky a použitý detekční systém pro danou protilátku jsou uvedeny v tabulce 6.1.

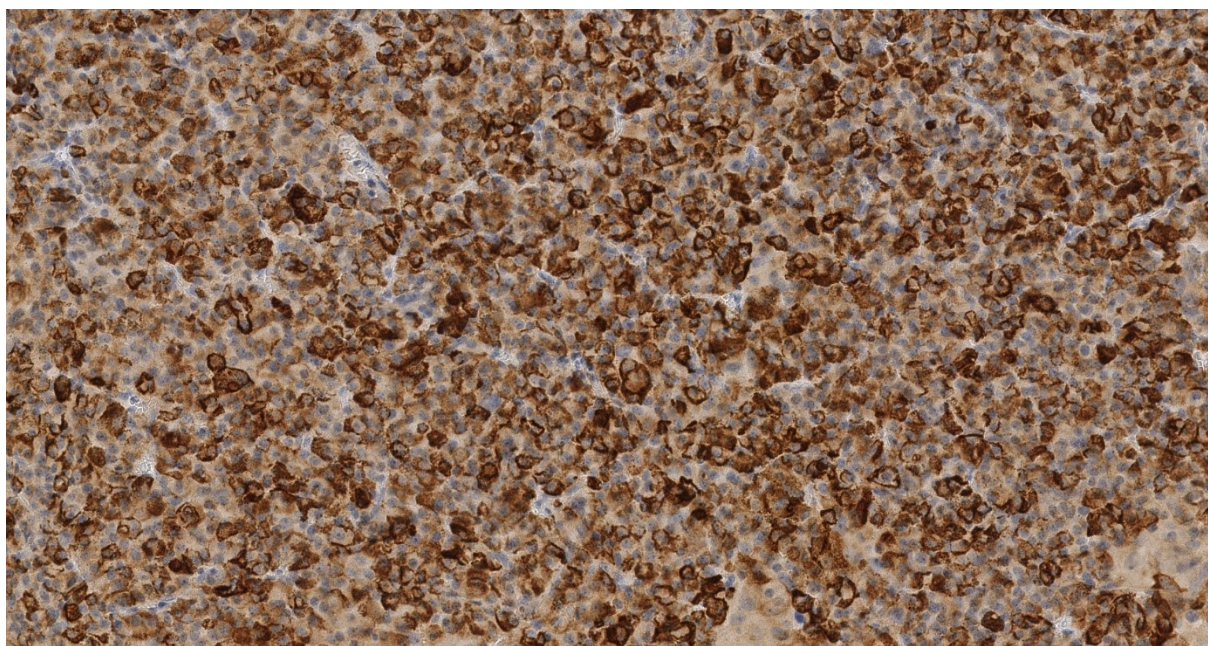
Imunohistochemické vyřetření prolaktinu, řTSH, cytokeratinu 18, Ki67, p53, SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR5, D2DR a E-cadherinu bylo provedeno ve všech dostupných vzorcích. Vyřetření exprese cytokeratinu 8/18 a STH bylo ve druhé době provedeno pouze ve vzorcích negativních v průkazu cytokeratinu 18. Vyřetření exprese AIP bylo provedeno pouze na vzorcích v podsouboru pacientů analyzovaných stran odpovědi na léčbu. Jako pozitivní kontrola imunohistochemické reakce slouřila tkář apendixu u cytokeratinu 18, cytokeratinu

8/18, E-cadherinu a Ki67, tkáň karcinomu prsu u p53, tkáň normální hypofýzy u prolaktinu,  $\beta$ TSH a D2DR, tkáň pankreatu s Langerhansovými ostrůvky u SSTR1, SSTR2A, SSTR3 a SSTR5 a tkáň varlete u AIP.

## **6.4 Hodnocení imunohistochemického vyšetření**

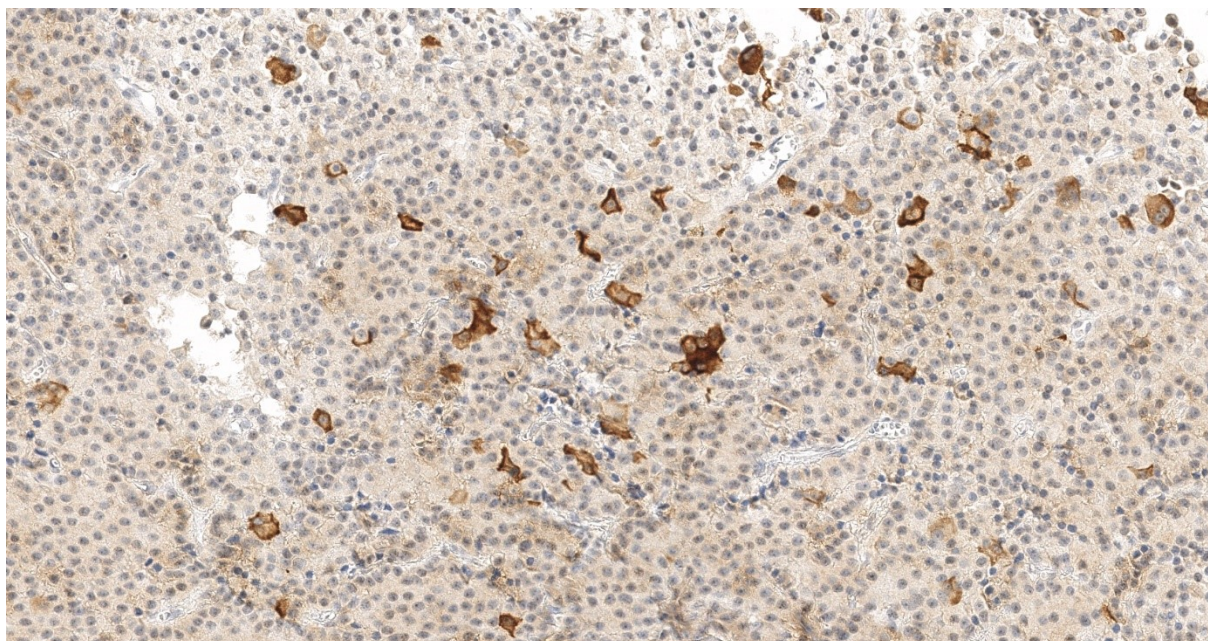
### **6.4.1 Hodnocení exprese prolaktinu a $\beta$ TSH**

Expresi prolaktinu a  $\beta$ TSH hodnotil autor ve tkáni tumoru pomocí světelné mikroskopie jako procentuální množství buněk tumoru vykazujících pozitivní imunohistochemickou reakci. Množství pozitivních buněk bylo hodnoceno zaslepeně ke klinickým údajům o pacientech. Reprezentativní příklady exprese prolaktinu a  $\beta$ TSH jsou na obrázcích 6.1 a 6.2. Totožným způsobem byla hodnocena exprese STH, která byla stanovena u některých tumorů s negativní expresí cytokeratinu 18 v případě, kdy další imunohistochemický a morfologický náález nesvědčil pro zařazení ani do jednoho z nádorových subtypů dle WHO/EPPG. Ke snížení variability měření na podkladě lidského faktoru hodnotitele (tzv. intraobserver variability) byly tyto parametry (prolaktin a  $\beta$ TSH) hodnoceny dvakrát, zaslepeně k původnímu měření, a výsledek pro další analýzy byl určen průměrem obou stanovených hodnot.



Obrázek 6.1 – Exprese prolaktinu v jednom z tumorů SLT skupiny (200x zvětšení)





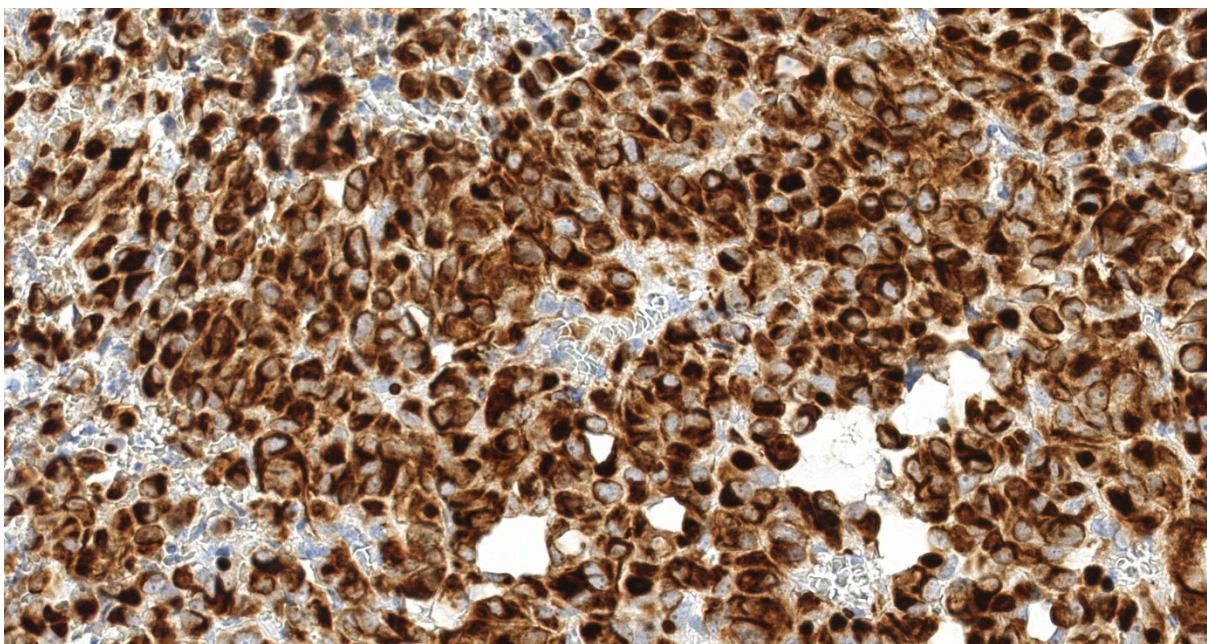
Obrázek 6.2 – Expres  $\beta$ TSH v jednom z tumorů plurihormonální skupiny (200x zvětšení)

#### 6.4.2 Hodnocení exprese cytokeratinu 18, cytokeratinu 8/18 a cytokeratinu AE1/3

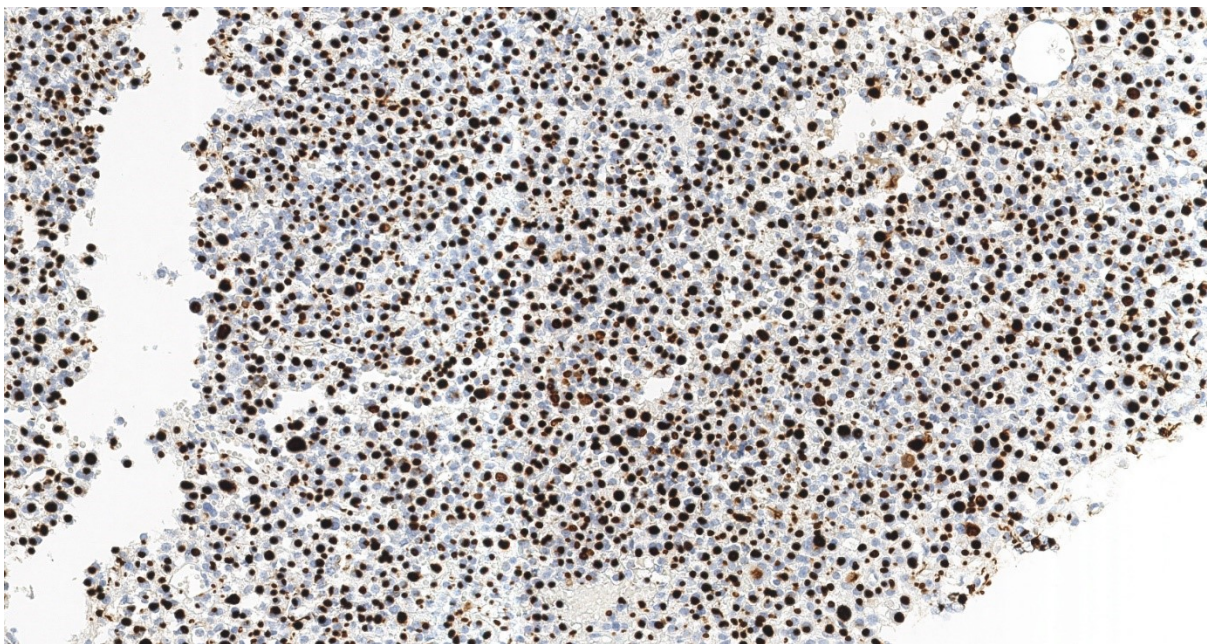
Expresi cytokeratinu 18 hodnotil autor ve tkáni tumoru pomocí světelné mikroskopie.

Zhodnocen byl charakter exprese (perinukleární, difúzní, fibrózní tělíska) a dále procentuální množství buněk s fibrózními tělísky. Reprezentativní příklady nádorů s perinukleární expresí cytokeratinu a fibrózními tělísky jsou na obrázcích 6.3 a 6.4. Množství buněk s fibrózními tělísky bylo hodnoceno zaslepeně ke klinickým údajům o pacientech. V případě, že vyšetření cytokeratinu 18 bylo negativní (arbitrárně definováno jako pozitivita v méně než 10 % buněk), bylo doplněno vyšetření exprese cytokeratinu 8/18 a cytokeratinu AE1/3. Výsledná pozitivita byla hodnocena stejným způsobem jako v případě cytokeratinu 18. Ke snížení variability měření na podkladě lidského faktoru hodnotitele (tzv. intraobserver variability) byly tyto parametry (cytokeratin 18 a cytokeratin 8/18) hodnoceny dvakrát, zaslepeně k původnímu měření, a výsledek pro další analýzy byl určen průměrem obou naměřených hodnot.





Obrázek 6.3 – Perinukleární exprese cytokeratinu 18 v jednom z tumorů DGST skupiny (400x zvětšení)



Obrázek 6.4 – Fibrózní tělíska pozitivní v průkazu cytokeratinu 18 v jednom z tumorů SGST skupiny (200x zvětšení)

Tabulka 6.1 – Použité protilátky a detaily imunohistochemických reakcí

Protilátka	Klon	Ředění	Výrobce	Demaskování epitopů	Délka inkubace	Detekční systém
Prolaktin	polyklonální	předředěná	Ventana, Tucson, AZ, USA	Ventana CC1, 64 min.	48 minut	Ventana ultraView
STH	EP267	1:200	Cell Marque, Rocklin, CA, USA	Ventana CC1, 32 min.	32 minut	Ventana OptiView
βTSH	polyklonální	předředěná	Ventana, Tucson, AZ, USA	Ventana CC1, 24 min.	32 minut	Ventana ultraView
P53	Bp53-11	předředěná	Ventana, Tucson, AZ, USA	Ventana CC1, 64 min.	24 minut	Ventana ultraView
Cytokeratin 18	DC10	1:50	Dako, Glostrup, Denmark A/S	Ventana CC1, 36 min.	32 minut	Ventana ultraView
Cytokeratin 8/18	L50-823	1:500	Cell Marque, Rocklin, CA, USA	Ventana CC1, 32 min.	36 minut	Ventana OptiView
Cytokeratin AE1/3	30-9	RTU	Ventana, Tucson, AZ, USA	Ventana CC1, 32 min.	16 minut	Ventana OptiView
GATA3	NCH-38	1:50	Dako, Glostrup, Denmark A/S	Ventana CC1, 52 min.	32 minut	Ventana ultraView
Ki67	30-9	předředěná	Ventana, Tucson, AZ, USA	Ventana CC1, 32 min.	16 minut	Ventana OptiView
E-cadherin	NCH-38	1:50	Dako, Glostrup, Denmark A/S	Ventana CC1, 52 min.	32 minut	Ventana ultraView
SSTR1	UMB7	1:100	Abcam, Cambridge, MA, USA	Tris-EDTA pH9, 97°C, 20 min.	30 minut	DAKO EnVision FLEX
SSTR2A	UMB1	1:1500	Abcam, Cambridge, MA, USA	Ventana CC1, 36 min.	32 minut	Ventana ultraView
SSTR3	UMB5	1:750	Abcam, Cambridge, MA, USA	Ventana CC1, 20 min.	36 minut	Ventana ultraView
SSTR5	UMB4	1:750	Abcam, Cambridge, MA, USA	Ventana CC1, 32 min.	32 minut	Ventana OptiView
D2DR	polyklonální	1:200	Origene, Rockville, MD, USA	Ventana CC1, 16 min.	32 minut	Ventana OptiView
AIP	35-2	1:2500	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA	Ventana CC1, 36 min.	36 minutes	Ventana ultraView

### 6.4.3 Hodnocení exprese Ki67 a p53

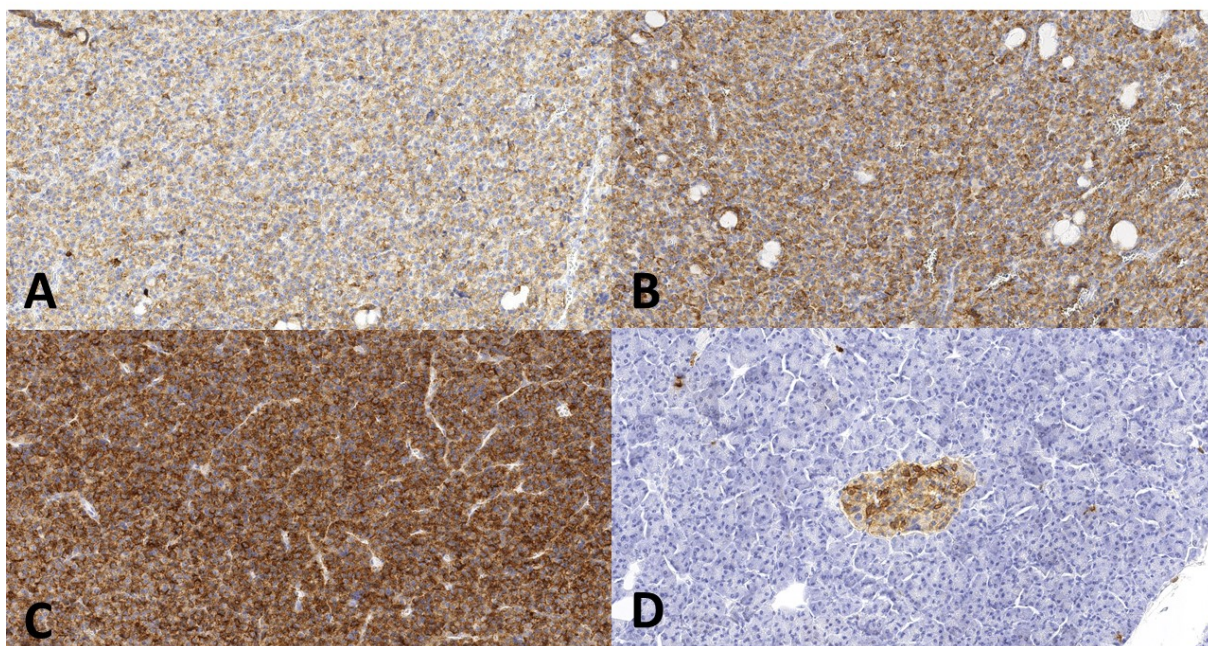
Expresi p53 a Ki67 hodnotil autor ve tkáni tumoru pomocí světelné mikroskopie a analýzy obrazu. V případě dostatečné velikosti tumoru bylo spočítáno množství jader silně pozitivních v průkazu p53 v 10 polích velkého zvětšení (400násobné zvětšení, 1 pole o ploše 0,196 mm<sup>2</sup>). Bylo-li napočítáno více než 10 silně pozitivních jader, byl tumor považován za p53 pozitivní (v souladu s (1)). Jinak byl tumor považován za p53 negativní. Pro přesné zhodnocení procenta Ki67-pozitivních buněk byly preparáty naskenovány skenerem obrazu Leica Aperio AT2. Z naskenovaných preparátů byl u každého případu vybrán jeden hot-spot s největším množstvím pozitivních jader, byla pořízena elektronická fotografie, ta byla následně vytištěna na barevné tiskárně a manuálně bylo spočítáno množství jader nádorových buněk vykazující jakkoliv intenzivní imunohistochemickou pozitivitu. U každého tumoru bylo spočítáno minimálně 500 jader. Výsledný podíl Ki67 pozitivních buněk ke všem spočteným buňkám byl vyjádřen procentem.

### 6.4.4 Hodnocení exprese SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR5 a D2DR

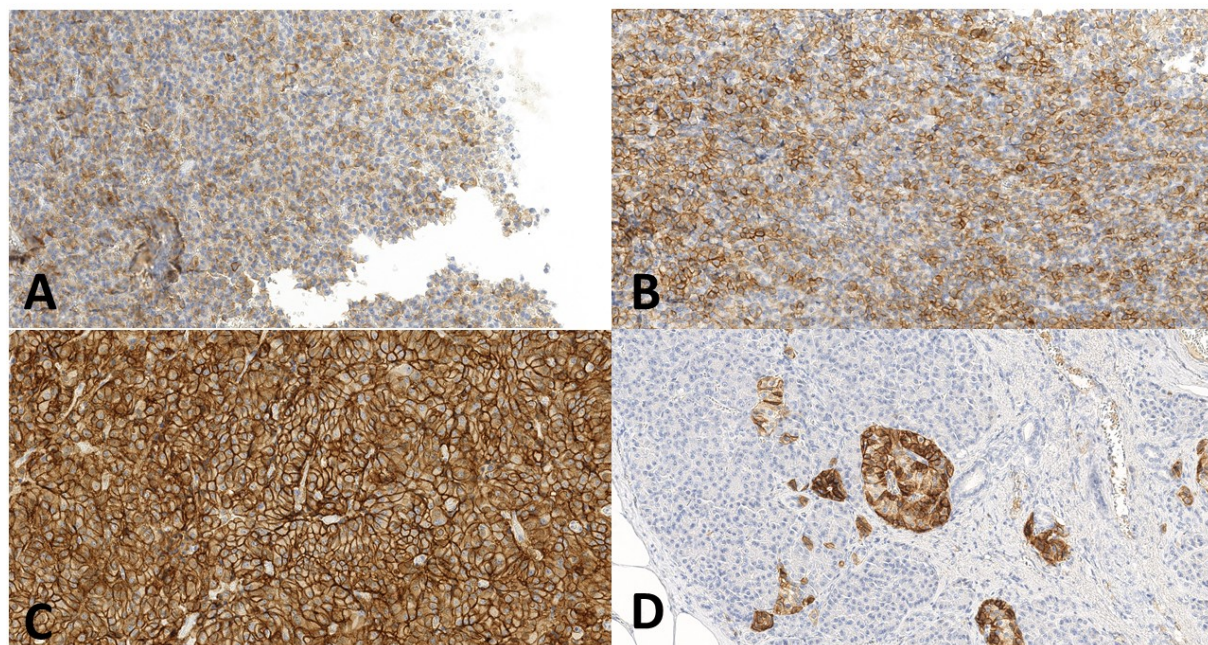
Expresi SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR5 a D2DR byla hodnocena formou H-skóre. H-skóre je představováno celočíselnou hodnotou v intervalu 0-300, jež reflektuje procentuální podíl imunoreaktivních buněk a intenzitu imunohistochemické reakce. Při hodnocení H-skóre bylo zaznamenáno nejprve procento slabě pozitivních buněk, procento středně silně pozitivních buněk a procento silně pozitivních buněk. Slabě pozitivitě byl přiřazen koeficient 1, střední pozitivitě 2 a silné pozitivitě 3. Reprezentativní příklady positivity pro jednotlivé SSTR a D2DR jsou znázorněny na obrázcích 6.5 – 6.9. H-skóre bylo vypočteno součtem násobků koeficientů intenzity a jejich procentuálního zastoupení ve tkáni tumoru: např. v případě tumoru s 30 % buněk se slabou pozitivitou, 10 % buněk se středně silnou pozitivitou a 20 % silně pozitivních buněk bylo výsledné H-skóre 110 ( $30 * 1 + 10 * 2 + 20 * 3$ ). Současně bylo zaznamenáno celkové procento pozitivních buněk (ve výše uvedeném příkladu by se jednalo o 60 %). Za pozitivní byla u SSTR2A a SSTR5 považována pouze membránová pozitivita, u SSTR1, SSTR3 a D2DR byla jako pozitivní považována membránová i cytoplazmatická pozitivita. Ke zvýšení přesnosti měření byla tímto postupem exprese výše uvedených proteinů hodnocena celkem 3 nezávislými pozorovateli (autor, MUDr. Monika Manethová, RNDr. et Mgr. Lenka Popovská) po předchozím konsenzuálním setkání u vícehlavého mikroskopu, kde byla pro každou jednotlivou protilátku diskutována intenzita positivity a způsob hodnocení procentuálního zastoupení buněčných populací. V některých komplexních případech vyznačil autor na skle pro potřeby hodnocení oblast se strukturami tumoru. Každý z pozorovatelů



hodnotil vzorky zaslepeně k hodnocení zbývajících dvou osob. Výsledná hodnota H-skóre i procentuálního zastoupení pozitivních buněk byla spočítána jako průměr těchto tří měření.

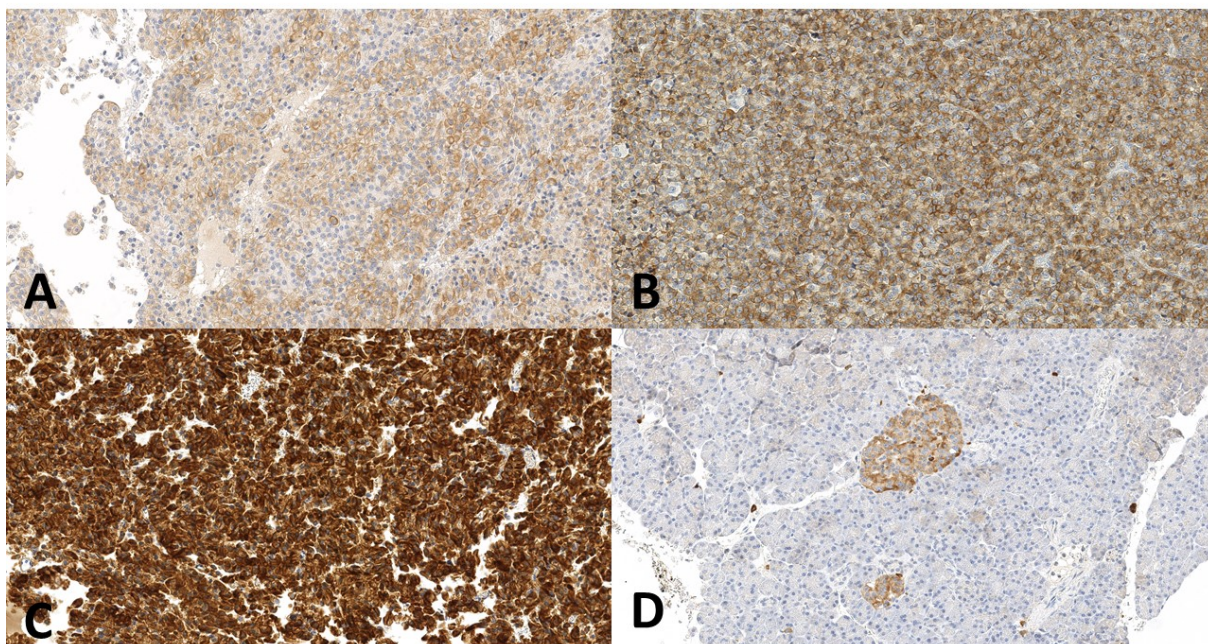


Obrázek 6.5 – Intenzity exprese SSTR1 (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas).

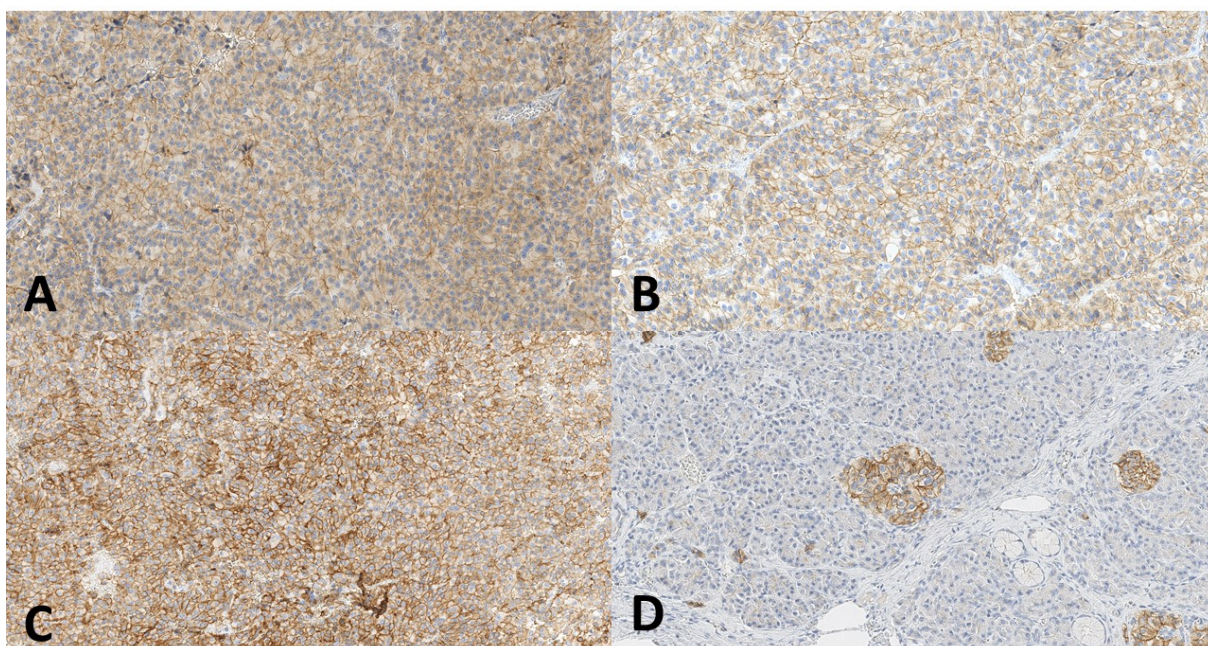


Obrázek 6.6 – Intenzity exprese SSTR2 (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas).



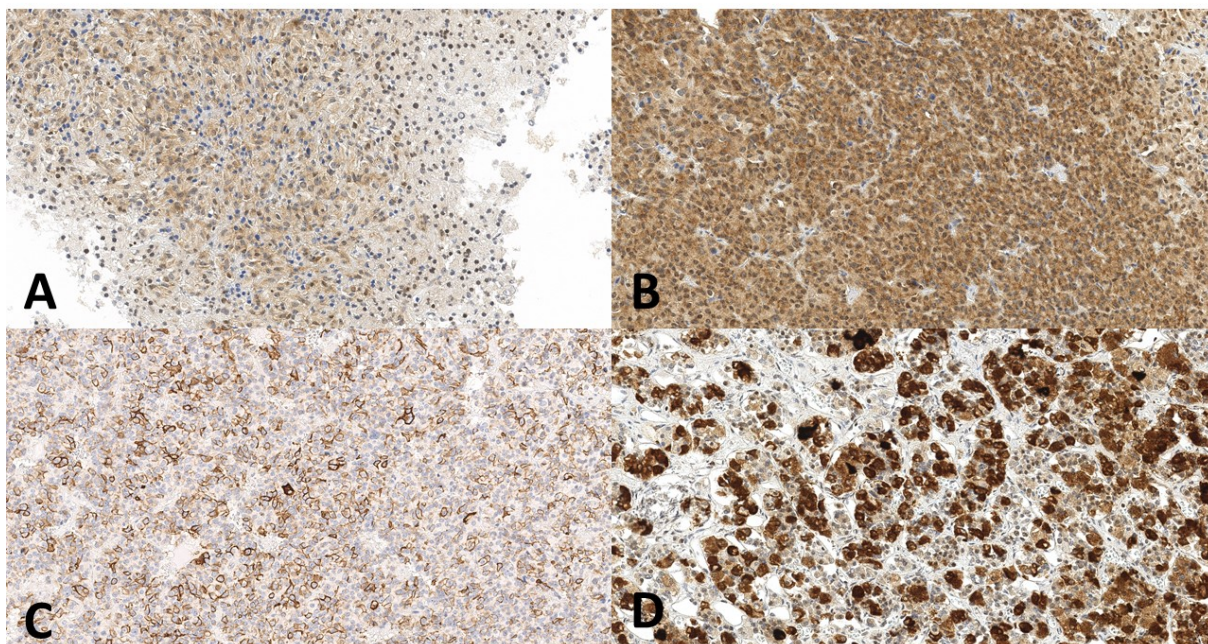


Obrázek 6.7 – Intenzity exprese SSTR3 (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas).



Obrázek 6.8 – Intenzity exprese SSTR5 (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas).



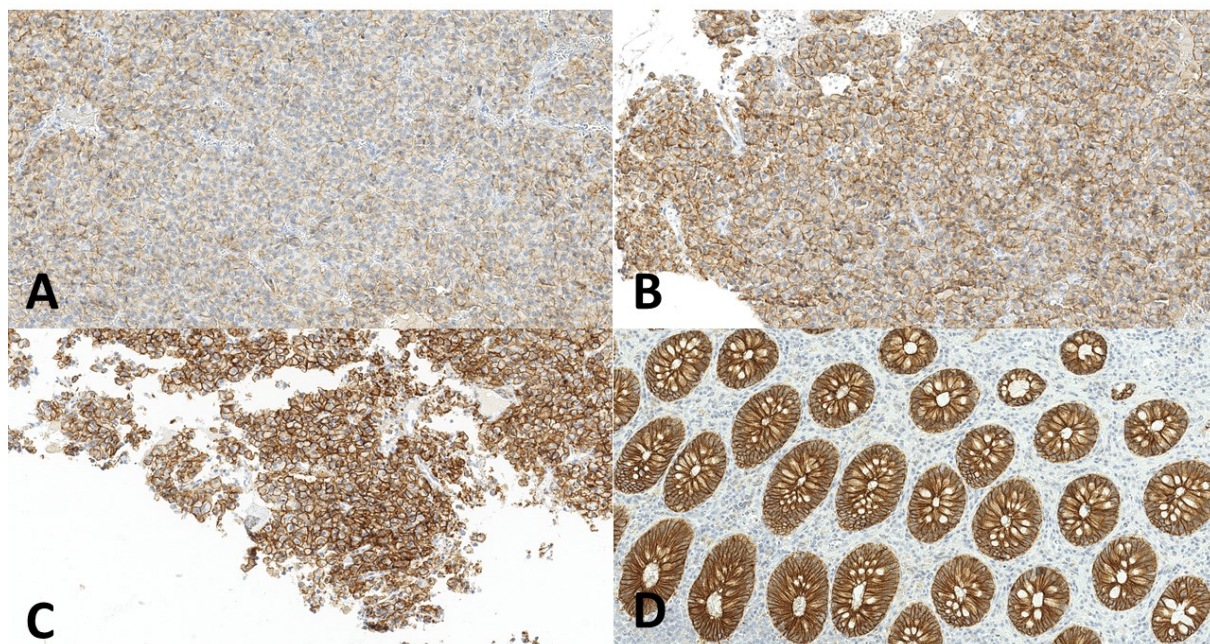


Obrázek 6.9 - Intenzity exprese D2DR (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas).

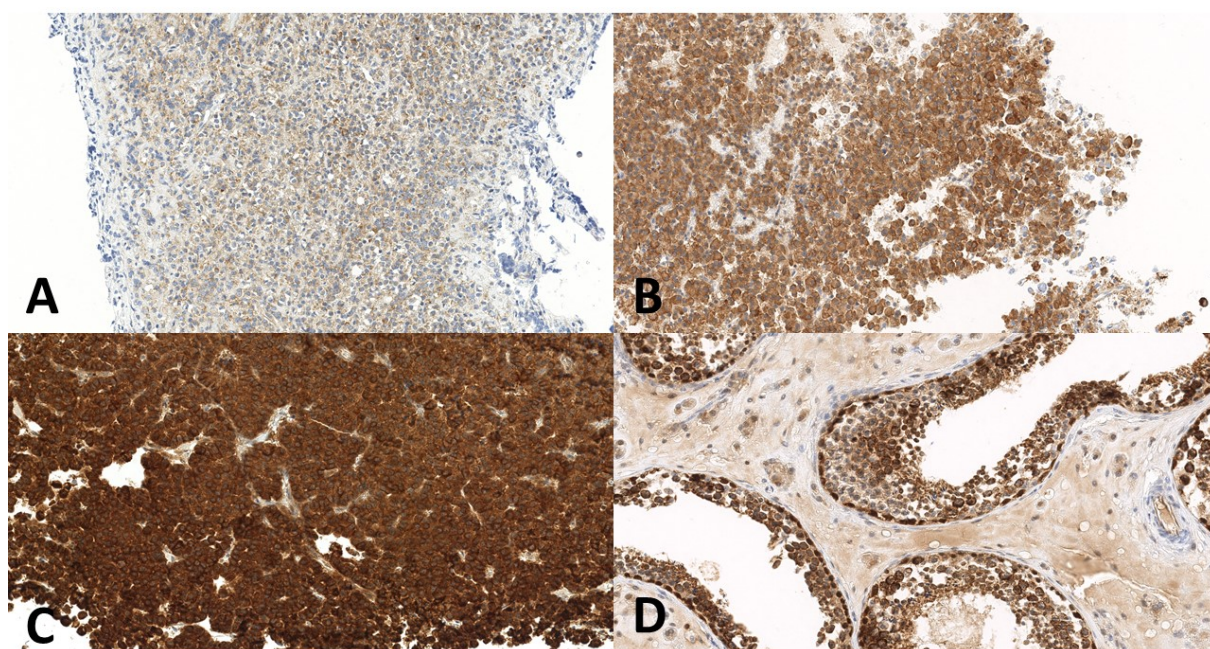
#### 6.4.5 Hodnocení exprese E-cadherinu a AIP

Expres E-cadherinu a AIP byl hodnocena formou H-skóre, totožným postupem uvedeným v sekci 6.4.4. V případě E-cadherinu byla hodnocena membránová pozitivita v tumoru, v případě AIP byla hodnocena cytoplazmatická pozitivita tumoru. Reprezentativní příklady positivity pro E-cadherin a AIP jsou znázorněny na obrázcích 6.10 a 6.11. K zvýšení přesnosti měření byla uvedeným postupem exprese stanovena celkem 2 nezávislími pozorovateli (autor a MUDr. Monika Manethová u AIP, autor a RNDr. et Mgr. Lenka Popovská u E-cadherinu) po předchozím konsenzuálním setkání u vícehlavého mikroskopu, kde byla pro obě protilátky diskutována intenzita positivity a způsob hodnocení procentuálního zastoupení buněčných populací. V některých komplexních případech vyznačil autor na skle pro potřeby hodnocení oblast se strukturami tumoru. Každý z pozorovatelů hodnotil vzorky zaslepeně k hodnocení druhé osoby. Výsledná hodnota H-skóre i procentuálního zastoupení pozitivních buněk byla spočítána jako průměr těchto dvou měření.





Obrázek 6.10 – Intenzity exprese E-cadherinu (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (appendix).



Obrázek 6.11 – Intenzity exprese AIP (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (varle).

#### **6.4.6 Hodnocení exprese GATA3**

U několika tumorů bez exprese cytokeratinů a s morfologií odpovídající SGST byla provedena detekce jaderné exprese GATA3, jež byla hodnocena jako jaderná pozitivita. V případě kompletní absence imunohistochemické reakce byla exprese vyhodnocena jako negativní, v případě jakékoli positivity v jakémkoli počtu buněk byla reakce hodnocena jako pozitivní.

#### **6.5 Subklasifikace nádorů podle patologických a radiologických parametrů**

Pro účely studie byly tumory klasifikovány dle stávající WHO klasifikace v úpravě doporučení EPPG(3, 16). Nádory s fibrózními tělisky ve více než 70 % buněk byly klasifikovány jako SGST bez ohledu na expresi dalších proteinů. Zbývající tumory byla klasifikovány jako plurihormonální v případě positivity  $\beta$ TSH ve  $> 1$  % buněk tumoru. Zbývající tumory byla klasifikovány jako „somatolaktotropní“ (SLT) v případě positivity prolaktinu v  $\geq 10$  % buněk. Zbývající tumory (tedy bez fibrózních tělísek, prolaktinu a  $\beta$ TSH) byly klasifikovány jako DGST. V případě negativního průkazu cytokeratinu 18 a cytokeratinu 8/18 byla pro klasifikaci zohledněna morfologie tumoru, koexprese prolaktinu,  $\beta$ TSH a případně též STH – tento postup je blíže popsán v sekci 7.3.4.1. Pro účely práce nebyla odlišována skupina somato-laktotropních tumorů a mammosomatotropních tumorů: obě tyto skupiny tumorů budou v práci dále označovány jako SLT. Pro účely této práce budou pod pojmem non-SGST označovány všechny tumory ze skupiny DGST, SLT a plurihormonálních tumorů. Za účelem subklasifikace podle radiologického parametru velikosti tumoru byly nádory rozděleny do následujících skupin: mikrotumory (největší průměr  $< 10$  mm), makrotumory (největší průměr 10-39 mm) a obří tumory (největší průměr  $\geq 40$  mm).

#### **6.6 Subklasifikace nádorů na proliferující a neproliferující a grade dle Trouillas**

Na podkladě údajů o mitotickém indexu, pozitivitě p53 a indexu Ki67 byl tumor klasifikován jako proliferující anebo neproliferující. Tato klasifikace byla provedena podle schématu uvedeného v tabulce 4.5 a diskutovaného v sekci 4.5.3. U části tumorů nebylo z důvodů malého množství dostupného histologického materiálu možné stanovit mitotickou aktivitu a/nebo pozitivitu p53. V případě absence dvou ze tří údajů nebyla subklasifikace u daného tumoru provedena. V případě absence pouze jednoho údaje byla subklasifikace provedena jen tehdy, pokud dva zbývající údaje měly totožnou hodnotu svědčící pro proliferující anebo neproliferující tumor (např. mitotická aktivita  $> 2$  mitózy/ 10 HPF a Ki67  $> 3$  % vedla k označení tumoru jako proliferujícího i přes absenci údaje o pozitivitě p53, např.

pro postupné vykrajování materiálu). U nádorů s dostupnými údaji o invazi byl vyhodnocen kompletní grade dle Trouillas: tumory hodnocené jako neinvazivní (Knospova klasifikace invaze sinus cavernosus 0, 1 a 2) a neproliferující byly označeny jako 1a, tumory invazivní (Knospova klasifikace invaze sinus cavernosus 3 a 4) a neproliferující byly označeny jako 2a, tumory neinvazivní a proliferující jako 1b a tumory invazivní a proliferující jako 2b.

## **6.7 Informatické zpracování a statistická analýza souboru**

Údaje byly zpracovány pomocí programů Microsoft Excel a Access. Samotná statistická analýza byla provedena v programu SigmaPlot 14.0 od firmy Systat Software, Inc. K ověření normality rozložení naměřených hodnot byl použit Shapiro-Wilkův test a k ověření shodnosti rozptylů Brown-Forsythův test. V případě předpokládané normální distribuce dat byly údaje ve výsledkové části uvedeny jako průměr hodnot a směrodatná odchylka (dále jen SD), v opačném případě (u předpokládané nenormální distribuce) jako medián a SD. V případě předpokládaného normálního rozložení analyzovaných hodnot byl k testování hypotéz u intervalových a poměrových dat použit parametrický Studentův t-test (u shodných rozptylů), Welchův t-test (u neshodných rozptylů) a dále jednofaktorová a dvoufaktorová analýza rozptylu (dále jen ANOVA). U hodnot bez předpokládané normální distribuce byl k testování hypotéz u intervalových a poměrových dat použit neparametrický test Mann-Whitneyův (dále jen MW) a Kruskal-Wallisův (dále jen KW). K post hoc analýze byla v případě ANOVA a dvoufaktorové ANOVA použita Holm-Šidákova metoda, u Kruskal-Wallisova testu pak test Dunnové. K testování nominálních dat byl v závislosti na velikosti testovaného souboru použit  $\chi^2$  test anebo Fischerův přesný test. K analýze korelace intervalových proměnných byl stanoven Pearsonův korelační koeficient u proměnných s předpokládaným normálním rozložením a Spearmanův korelační koeficient u proměnných bez předpokládaného normálního rozložení. Hladina významnosti všech použitých testů považovaná za statisticky signifikantní byla  $p < 0,05$ . Číselné hodnoty výsledků byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa.

*„Vesmír (který jiní nazývají Knihovnou) je vytvářen šestiúhelníkovými galeriemi, jejichž počet je neurčitý a možná i nekonečný.“*

*- Jorge Luis Borges, Babylonská knihovna*

## **7. Výsledky**

### **7.1 Obecné klinicko-patologické charakteristiky testovaného souboru**

Celkově bylo v rámci této práce analyzováno celkem 114 tumorů od 110 pacientů: 4 pacienti byli operováni dvakrát. K vlastní analýze byly použity tkáně tumorů z první operace.

V jednom případě neumožňovalo množství nádorové tkáně z první operace histologickou analýzu, a proto byl ve studii použit vzorek z druhé operace provedené v odstupu 7 měsíců.

V tomto intervalu nebyl pacient léčen farmakologicky ani radioterapeuticky. Celkem 9 pacientů (8,18 %) absolvovalo před první operací léčbu SSA první generace (oktreotid anebo lanreotid) a 4 pacienti léčbu cabergolinem. Bližší analýza této podskupiny ve srovnání se skupinou nepředléčených pacientů je obsažena v sekci 7.2. Do následující analýzy jsou zahrnuti pacienti z celého souboru (n=110). Množství případů poskytnutých z jednotlivých pracovišť je uvedeno v tabulce 7.1. Statistické parametry celého vyšetřeného souboru (průměr, medián, směrodatná odchylka – dále jen SD) pro intervalové proměnné jsou shrnuty v tabulce 7.2. Podíl mužů a žen v souboru je zaznamenán v grafu č. 7.1, podíl invazivních a neinvazivních tumorů je zaznamenán v grafu č. 7.2, zastoupení jednotlivých kategorií gradingu dle Trouillas je zaznamenáno v grafu č. 7.3 a zastoupení velikostních kategorií tumorů je zaznamenáno v grafu č. 7.4. V některých případech se nepodařilo dohledat část klinických údajů (vstupní velikost tumor, sérové hladiny IGF1, STH, prolaktinu a TSH). Absence těchto parametrů se vyskytla u případů ze všech pracovišť účastných studie. Údaje o invazi nádorů jsme získali dodatečnou revizí snímků z MRI u pacientů operovaných ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové a v Ústřední vojenské nemocnici ve Střešovicích. U všech těchto parametrů je v tabulce 7.2 uvedeno množství pacientů s dostupnými údaji (n). Četnosti kategorických proměnných jsou shrnuty v tabulce 7.3. Samotná problematika histologického subtypu je dále diskutována v sekcích 7.3.3.1-2.

Celkem 31 pacientů (28,18 %) splňovalo požadavek na léčbu SSA bez dalšího operačního anebo radioterapeutického zákroku přímo v průběhu léčby SSA: tyto pacienti byli analyzováni v části studie zabývající se prediktivními faktory pro odpověď na léčbu SSA. Vlastnosti této podskupiny a její rozbor jsou blíže diskutovány v sekci 7.4



Tabulka 7.1 – Množství pacientů v závislosti na jednotlivých pracovištích zapojených do studie

	Množství pacientů ve studii	Celkové procento případů
Ústřední vojenská nemocnice Praha	85	77,27 %
Fakultní nemocnice Hradec Králové	9	8,18 %
Fakultní nemocnice Plzeň	6	5,45 %
Fakultní nemocnice Brno, Bohunice	5	4,55 %
Univerzitní nemocnice L. Pasteura, Košice	4	3,64 %
Fakultní nemocnice s poliklinikou Nové Zámky	1	0,90 %
Celkem	110	100 %

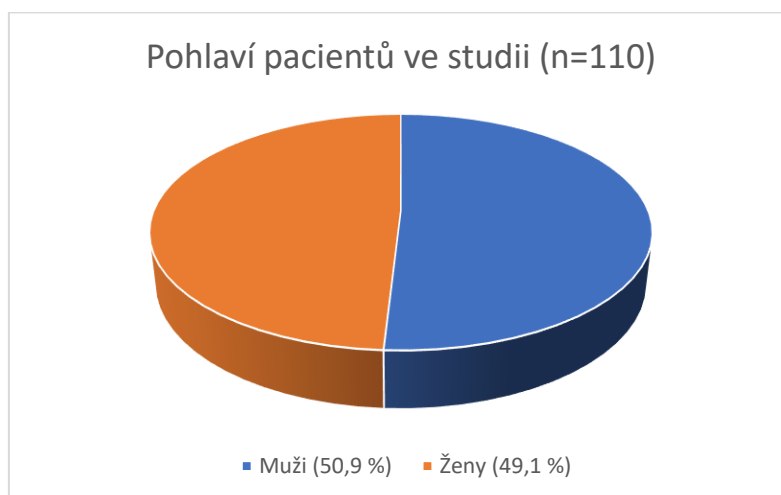
Tabulka 7.2 – Základní statistické parametry vyšetřeného souboru (n=110) pro intervalové proměnné.

	Průměr	Medián	S.D.
Věk (roky)	48,19	48,50	13,61
Hladina STH ( $\mu\text{g/l}$ , n=104)	53,77	31,51	62,83
Hladina prolaktinu ( $\mu\text{g/l}$ , n=103)	149,56	16,07	465,00
Hladina TSH (mIU/l, n=101)	1,12	0,94	0,88
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, n=105)	312,10	290,00	130,10
Největší rozměr tumoru (mm, n=104)	20,25	19,00	9,27
Objem tumoru ( $\text{mm}^3$ , n=92)	4645,68	2101,84	7196,05
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (%)	19,80	5,00	26,30
Množství $\beta\text{TSH}$ imunoreaktivních buněk (%)	2,00	0	7,93
Množství buněk s fibrózními tělísky (%)	45,60	35,00	41,80
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (%)	3,08	2,91	1,93
Množství mitóz (/10HPF, n=102)	0,49	0	0,89
H-skóre pro E-cadherin	107,94	120,00	96,70
H-skóre pro SSTR1	9,96	1,00	25,50
H-skóre pro SSTR2A	169,79	177,50	86,26
H-skóre pro SSTR3	75,81	59,10	67,95
H-skóre pro SSTR5	87,56	74,16	69,90
H-skóre pro D2DR	36,77	22,00	37,77
H-skóre pro AIP (n=31)	234,52	240,00	38,62

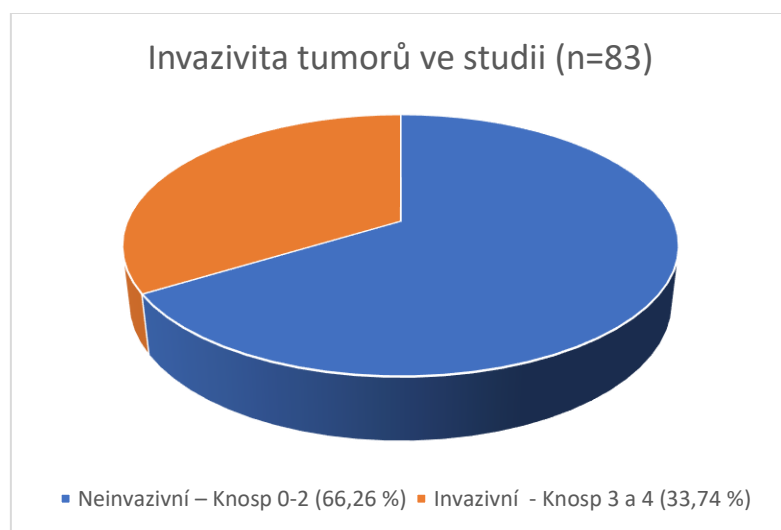


Tabulka 7.3 – Četnosti zastoupení kategorických proměnných vyšetřené souboru (n=110)

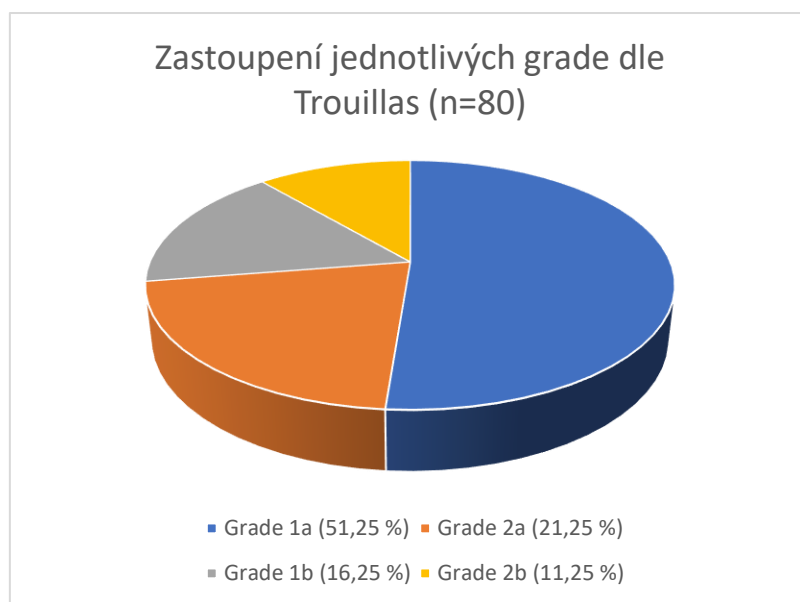
Pohlaví (n=110)	Ženy – 54 (49,10 %)	Muži – 56 (50,90 %)
Pozitivita p53 (n=107)	Negativní - 61 (57,00 %)	Pozitivní – 46 (43,00 %)
Průkaz cytokeratinu 8/18 (n=110)	Pozitivní – 101 (91,80 %)	Negativní – 9 (8,20 %)
Velikost tumorů (n=104)	Mikrotumory – 13 (12,51 %)	Makrotumory – 87 (83,64 %)
	Obří tumory - 4 (3,85 %)	
Velikost makrotumorů (n=87)	10–24 mm– 64 (73,57 %)	25–40 mm– 23 (26,43 %)
Invazivita tumorů (n=83)	Neinvazivní – 55 (66,26 %)	Invazivní - 28 (33,74 %)
Proliferativita (n=107)	Trouillas „A“ – 75 (70,01 %)	Trouillas „B“ – 32 (29,99 %)
Grade dle Trouillas (n=80)	1a – 41 (51,25 %)	1b – 13 (16,25 %)
	2a – 17 (21,25 %)	2b – 9 (11,25 %)



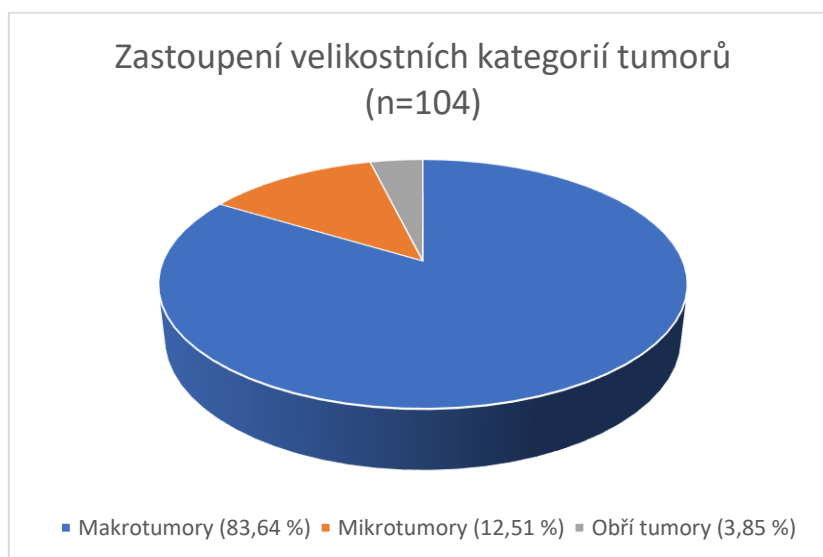
Graf č. 7.1 – Pohlaví pacientů ve studii



Graf č. 7.2 – Invazivita tumorů ve studii



Graf č. 7.3 – Zastoupení jednotlivých kategorií grade dle Trouillas



Graf č. 7.4 – Zastoupení jednotlivých velikostních kategorií v souboru

## 7.2 Klinickopatologické charakteristiky podsouboru s neoadjuvantní farmakologickou léčbou SSA/DA a její vliv na patologické parametry tumorů

### 7.2.1 Neoadjuvantní léčba SSA první generace a její vliv na patologické parametry tumorů

V podskupině s neoadjuvantní léčbou SSA první generace (oktreotid, lanreotid) bylo zahrnuto celkem 9 pacientů (8,18 %). Medián trvání léčby navazující před vlastní operací byl 10 měsíců, průměr byl 14,78 měsíců,  $SD \pm 10,94$ . Průměrná doba mezi ukončením léčby SSA a operací byla 7,36 měsíce, medián tohoto intervalu 1 měsíc. Z těchto 9 tumorů patřilo 5 do skupiny SGST, 2 do skupiny DGST a 2 do skupiny SLT. Relativní zastoupení tumorů

rámcově korespondovalo s distribucí jednotlivých subtypů v celém souboru (viz sekce 7.3.4.2), s lehkou převahou SGST ve skupině předléčených (55 % oproti 40,90 % v celém souboru). Rozdíly mezi skupinou pacientů s neoadjuvantní léčbou a bez ní jsou popsány v tabulce 7.4. Kategorické proměnné obou skupin a jejich analýza jsou shrnuty v tabulce 7.5. V grafu č. 7.5 je znázorněn index Ki67 ve skupině pacientů s předchozí léčbou a bez léčby. Z důvodů popsaných v sekci 7.1 nebyla klinická data dostupná u jediného pacienta ze skupiny předléčených.

Z důvodů vyššího zastoupení SGST v předléčené skupině (55 % oproti 39,60 %) jakožto možného confounding faktoru jsme následně doplnili analýzu exprese E-cadherinu a SSTR2A mezi skupinou non-SGST v předléčené a nepředléčené skupině. Význam statistické analýzy byl limitován velikostí předléčené skupiny (n=4) oproti nepředléčené skupině (n=61). Exprese E-cadherinu se mezi oběma skupinami signifikantně nelišila ( $P = 0,379$ , Studentův t-test) a též se nelišila exprese SSTR2A ( $P = 0,272$ , Mann-Whitney-u test).

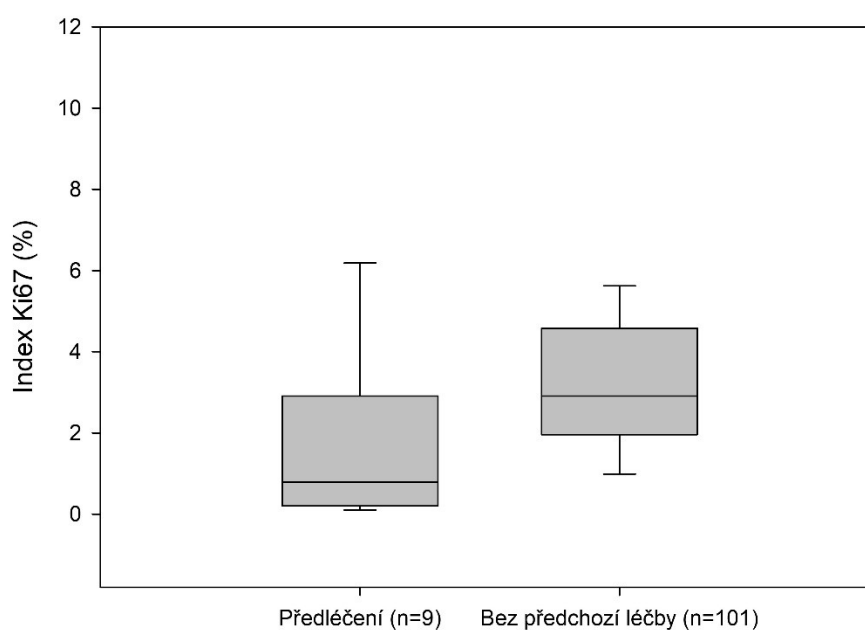
Tabulka 7.4 – Rozdíly intervalových proměnných mezi skupinou předléčených (n=9) a nepředléčených pacientů (n=101)

	Předléčení (±SD)	Nepředléčení (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	44,11±14	48,55±13,58	P = 0,36 (Studentův t- test)
Hladina STH (µg/l, medián)	45,32±43,88	31,51±64,33	P = 0,62 (MW)
Hladina prolaktinu (µg/l)	279±1174,88	14,7±302,23	<b>P = 0,03 (MW)*</b>
Hladina TSH (mIU/l, medián)	0,70±0,31	0,98±0,90	P = 0,22 (MW)
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, medián)	400±149,40	289,30±128,70	P = 0,28 (MW)
Největší rozměr tumoru (mm, medián)	20,50±7,96	19±9,40	P = 0,61 (MW)
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	3369,6±6712,50	2059,20±7256,58	P = 0,16 (MW)
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (%, medián)	15±20,70	5±26,80	P = 0,64 (MW)
Množství βTSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0±0	0±8,26	P = 0,08 (MW)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% , medián)	71±42,60	32,50±41,90	P = 0,45 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , medián)	0,79±2,06	2,91±1,93	<b>P = 0,02 (MW)*</b>
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0±0,33	0±0,91	P = 0,14 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	104±75,46	125±98,15	P = 0,21 (MW)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	1,33±8,84	1±26,47	P = 0,81 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	126,66± 80,17	180±85,96	P = 0,07 (MW)
H-skóre pro SSTR3 (medián)	46,83±62,40	66,73±68,59	P = 0,67 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	101,33±56,67	70±71,17	P = 0,59 (MW)
H-skóre pro D2DR (medián)	20,67±30,05	24,16±38,38	P = 0,30 (MW)
H-skóre pro AIP ( průměr)	223,21±31,51	237,81±40,45	P = 0,39 (Studentův t- test)

Tabulka 7.5 - Rozdíly kategorických proměnných mezi skupinou předléčených (n=9) a nepředléčených pacientů (n=101)

	Předléčení	Nepředléčení	P-hodnota, test
Pohlaví			
Ženy	4	50	P = 0,96 ( $\chi^2$ )
Muži	5	51	
Pozitivita p53			
Pozitivní	1	45	P = 0,09 ( $\chi^2$ )
Negativní	8	53	
Proliferativita			
Trouillas „A“	8	67	P = 0,37 ( $\chi^2$ )
Trouillas „B“	1	31	
Invaze			
Neinvazivní	3	52	P = 0,22 (Fisherův přesný test)
Invazivní	4	24	
Grade dle Trouillas			
1a	3	38	P = 0,08 ( $\chi^2$ )
2a	4	13	
1b	0	13	
2b	0	9	

Vliv předchozí léčby SSA na index Ki67



Graf č. 7.5 – Rozdíl indexu Ki67 mezi pacienty s předchozí léčbou SSA a bez léčby

### 7.2.2 Neoadjuvantní léčba cabergolinem a její vliv na patologické parametry tumorů

Neoadjuvantní léčba cabergolinem byla zjištěna celkem u 4 pacientů, z toho 3 z pacientů spadali do skupiny s neoadjuvantní léčbou SSA diskutovanou v sekci 7.2.1. V těchto třech případech byl medián trvání léčby 5 měsíců a léčba byla ukončena nejméně 14 měsíců před operací. Poslední případ byl SLT léčený cabergolinem po dobu 7 měsíců předcházejících operaci. Množství těchto případů neumožňovalo další smysluplnou statistickou analýzu.

Vzhledem k vlastní časové souslednosti (poměrně velký odstup mezi přerušením léčby a operací anebo naopak příliš krátký odstup mezi zahájením terapie a operací) a nízkému zaznamenanému procentu terapeutické odpovědi na cabergolin v literatuře (viz sekce 4.7.8) jsme a priori vyhodnotili vliv předchozí léčby cabergolinem, izolovaně či v kombinaci, na patologické charakteristiky tumoru jako zanedbatelný.

### 7.2.3 Morfologické změny v tumorech u nemocných předléčených analogy

V nádorech s předcházející léčbou SSA/DA (n= 10, tj 9 pacientů předléčených SSA a 1 pacient předléčený DA) byla zhodnocena přítomnost morfologických změn popisovaných po farmakologické léčbě, především v podobě hyalinizace stromatu. Vztah mezi histologickým subtypem a přítomností změn nebyl statisticky signifikantní (P = 1, Fisherův přesný test). U mužů byly změny patrné v 1/6 případů, u žen ve 4/4 případů (P = 0,048, Fisherův přesný test). Dále byly analyzovány zbývající dostupné patologické a klinické parametry obou podskupin (pacienti s léčebnými změnami a beze změn) shrnuté v tabulkách 7.2 a 7.3. Jediným parametrem, jímž se obě skupiny signifikantně lišily, byla vstupní hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, průměr 469 % ve skupině se změnami oproti 258 % ve skupině beze změn, p = 0,01, Welchův t-test pro neshodné rozptyly).

Tabulka 7.6 – Přehled morfologických změn v tumorech po předchozí léčbě SSA/DA

	Léčba DA	Léčba SSA	Věk a pohlaví	Typ nádoru	Morfologické změny
Případ č. 1	Ano	Ne	44, muž	SLT	žádné
Případ č. 2	Ano	Ano	54, muž	SGST	žádné
Případ č. 3	Ano	Ano	59, žena	DGST	výrazné
Případ č. 4	Ano	Ano	61, muž	SLT	lehké
Případ č. 5	Ne	Ano	22, žena	SGST	lehké
Případ č. 6	Ne	Ano	43, muž	SGST	žádné
Případ č. 7	Ne	Ano	36, muž	SGST	žádné
Případ č. 8	Ne	Ano	47, žena	SGST	lehké
Případ č. 9	Ne	Ano	50, žena	SLT	lehké
Případ č. 10	Ne	Ano	25, muž	DGST	žádné

### **7.3 Analýza prognostického významu jednotlivých studovaných parametrů souboru**

#### **7.3.1 Obecné poznámky k analýze prognostických faktorů**

Jako ukazatel agresivity onemocnění byla pro analýzu prognostických faktorů zvolena hladina IGF1 a dále největší rozměr a objem tumoru. V rámci analýzy byla dále jako ukazatel klinických vlastností tumoru zhodnocena i sérová hladina prolaktinu TSH a STH, ačkoliv tyto parametry nelze považovat za ukazatele agresivity onemocnění. Vzhledem k signifikantně nižší expresi Ki67 u pacientů po předchozí léčbě SSA byl ve všech následujících analýzách význam exprese Ki67 hodnocen **pouze** na podskupině pacientů bez předchozí léčby SSA. Obdobně tomu bylo u proliferativity, neboť Ki67 je jedním z definujících parametrů tohoto ukazatele, a u celkového grade dle Trouillas.

#### **7.3.2 Korelační analýza zkoumaných faktorů s potenciálním prognostickým významem**

Korelační analýza byla provedena pro spojitě hodnoty a její výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.7. V případě statisticky signifikantního výsledku Spearmannovy korelace byl v daném případě doplněn Pearsonův korelační koeficient v druhé době k posouzení linearity závislosti daných veličin. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v tabulce 7.8. V rozsahu našeho souboru jsme pozorovali několik signifikantních pozitivních a negativních korelací. Všechny korelační koeficienty se pohybovaly v intervalu od -0,39 do 0,351, což odpovídá relativně mírné závislosti analyzovaných veličin.

Tabulka 7.7 – Korelační analýza spojitých patologických parametrů ve vztahu k prognostickým charakteristikám souboru. Jednotky kategorií jsou uvedeny v textu. Statisticky signifikantní hodnoty jsou vyznačeny tučným fontem.

	IGF1 (sérum)	Průměr	Objem	STH (sérum)	Prolaktin (sérum)	TSH (sérum)
Věk	<b>r=0,20</b> <b>p=0,04</b>	<b>r=-0,21</b> <b>p=0,032</b>	r=-0,19 p=0,06	<b>r=-0,26</b> <b>p=0,007</b>	r=0,014 p=0,89	r=0,018 p=0,86
Imunoreaktivita prolaktinu (%)	$\rho=-0,053$ p=0,58	$\rho=-0,07$ p=0,46	$\rho=-0,15$ p=0,17	$\rho=-0,10$ p=0,28	<b><math>\rho=0,3</math></b> <b>p=0,002</b>	$\rho=-0,06$ p=0,7
Imunoreaktivita $\beta$ TSH (%)	$\rho=-0,08$ p=0,41	$\rho=-0,09$ p=0,34	$\rho=-0,14$ p=0,7	$\rho=-0,08$ p=0,4	$\rho=-0,02$ p=0,87	$\rho=0,11$ p=0,27
Množství fibrózních tělísek (%)	$\rho=0,01$ p=0,9	$\rho=0,05$ p=0,6	$\rho=0,03$ p=0,8	$\rho=-0,12$ p=0,26	$\rho=0,002$ p=0,98	$\rho=0,006$ p=0,95
Ki67 (%) (n=101)	$\rho=0,09$ p=0,34	$\rho=0,11$ p=0,27	$\rho=0,10$ p=0,36	<b><math>\rho=0,351</math></b> <b>p=0,0005</b>	$\rho=0,15$ p=0,15	$\rho=0,11$ p=0,29
Mitózy/10 HPF	$\rho=0,033$ p=0,75	$\rho=-0,03$ p=0,76	$\rho=0,04$ p=0,74	$\rho=0,053$ p=0,6	$\rho=-0,04$ p=0,67	$\rho=0,06$ p=0,54
H-skóre pro E- cadherin	$\rho=-0,02$ p=0,81	<b><math>\rho=-0,23</math></b> <b>p=0,017</b>	<b><math>\rho=-0,28</math></b> <b>p=0,006</b>	$\rho=0,04$ p=0,67	$\rho=0,01$ p=0,86	$\rho=-0,06$ p=0,55
H-skóre pro SSTR1	$\rho=0,05$ p=0,64	$\rho=-0,06$ p=0,55	$\rho=-0,11$ p=0,28	$\rho=0,07$ p=0,49	$\rho=-0,01$ p=0,94	$\rho=-0,06$ p=0,55
H-skóre pro SSTR2A	$\rho=0,1$ p=0,3	<b><math>\rho=-0,21</math></b> <b>p=0,03</b>	<b><math>\rho=-0,23</math></b> <b>p=0,03</b>	$\rho=0,06$ p=0,53	$\rho=-0,11$ p=0,27	$\rho=-0,1$ p=0,33
H-skóre pro SSTR3	$\rho=0,06$ p=0,53	$\rho=-0,03$ p=0,79	$\rho=0,01$ p=0,95	<b><math>\rho=0,21</math></b> <b>p=0,03</b>	$\rho=-0,02$ p=0,85	$\rho=-0,06$ p=0,58
H-skóre pro SSTR5	$\rho=-0,05$ p=0,64	$\rho=0,13$ p=0,18	$\rho=0,09$ p=0,36	$\rho=-0,04$ p=0,7	$\rho=0,02$ p=0,85	$\rho=-0,002$ p=0,99
H-skóre pro D2DR	<b><math>\rho=-0,28</math></b> <b>p=0,003</b>	$\rho=-0,05$ p=0,6	$\rho=-0,05$ p=0,63	$\rho=0,03$ p=0,78	$\rho=0,02$ p=0,83	<b><math>\rho=0,27</math></b> <b>p=0,007</b>
H-skóre pro AIP (n=31)	r=0,21 0,24	r=-0,002 0,99	r=0,025 0,89	r=0,19 0,3	<b>r=-0,39</b> <b>0,03</b>	r=-0,02 0,89



Tabulka 7.8 – Pearsonova korelace u dvojic parametrů se statisticky signifikantní hodnotou pro  $\rho$ .

	Spearmanovo $\rho$ a p	Pearsonovo r a p	Interpretace závislosti
Imunoreaktivita prolaktinu a sérová hladina prolaktinu	$\rho = 0,3$ , $p = 0,002$	$r = 0,17$ , $p = 0,09$	Nelineární závislost
Index Ki67 a sérová hladina STH	$\rho = 0,351$ , $p = 0,0005$	$r = 0,29$ , $p = 0,005$	Lineární závislost
H-skóre E-cadherinu a největší průměr tumoru	$\rho = -0,23$ , $p = 0,017$	$r = -0,22$ , $p = 0,03$	Lineární závislost
H-skóre E-cadherinu a objem tumoru	$\rho = -0,28$ , $p = 0,006$	$r = -0,09$ , $p = 0,4$	Nelineární závislost
H-skóre SSTR2A a největší průměr tumoru	$\rho = -0,21$ , $p = 0,03$	$r = -0,2$ , $p = 0,04$	Lineární závislost
H-skóre SSTR2A a největší objem tumoru	$\rho = -0,23$ , $p = 0,03$	$r = -0,14$ , $p = 0,18$	Nelineární závislost
H-skóre SSTR3 a sérová hladina STH	$\rho = 0,21$ , $p = 0,03$	$r = 0,24$ , $p = 0,02$	Lineární závislost
H-skóre D2DR a sérová hladina IGF1	$\rho = -0,28$ , $p = 0,003$	$r = -0,3$ , $p = 0,002$	Lineární závislost
H-skóre D2DR a sérová hladina TSH	$\rho = 0,27$ , $p = 0,007$	$r = 0,24$ , $p = 0,02$	Lineární závislost

### 7.3.3 Analýza významu kategorických proměnných (pohlaví, proliferativita, invaze, grade dle Trouillas) na klinickopatologické parametry tumorů

V tabulce 7.9 jsou analyzovány rozdíly intervalových proměnných mezi nádory u mužů a u žen. V tabulce 7.10 jsou v těchto dvou skupinách (muži a ženy) analyzovány kategorické proměnné. Ve skupině žen bylo 50 tumorů pozitivních v průkazu cytokeratinu 18 případně cytokeratinu 8/18, zatímco 4 tumory byly negativní. Obdobný byl nález ve skupině mužů, kde bylo identifikováno celkem 5 cytokeratin 18 negativních tumorů a 51 tumorů bylo pozitivních; distribuce byla obdobná mezi oběma pohlavími a lze tedy usuzovat, že na pohlaví nezávislá.

Tabulka 7.9 – Vliv pohlaví na klinickopatologické parametry souboru

	Muži (±SD)	Ženy (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	45,35±12,83	51,13±13,87	<b>P = 0,025</b> (Studentův t-test)
Hladina STH (µg/l, medián)	30,21±65,75	34,74±60,03	P = 0,35 (MW)
Hladina prolaktinu (µg/l, medián)	17,70±598,70	13,17±239,26	P = 0,10 (MW)
Hladina TSH (mIU/l, medián)	0,98±0,69	0,88±1,05	P = 0,40 (MW)
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, medián)	300±107,90	289,30±150,70	P = 0,88 (MW)
Největší rozměr tumoru (mm, medián)	18±9,37	20±9,14	P = 0,19 (MW)
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	1856±8288,93	2471±5801,30	P = 0,31 (MW)
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% , medián)	10±24,70	5±28,10	P = 0,82 (MW)
Množství βTSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0±5,87	0±9,68	P = 0,06 (MW)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% , medián)	30±40,60	60±42,50	P = 0,09 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , medián)	3,10±2,09	2,72±1,75	P = 0,35 (MW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0±0,86	0±0,92	P = 0,95 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	143,5±95,65	104,50±97,78	P = 0,20 (MW)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	1,33±33,34	0,67±12,56	P = 0,50 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	192,33±74,99	170,67±93,41	<b>P = 0,049 (MW)</b>
H-skóre pro SSTR3 (medián)	68,20±64,89	52,68±71,58	P = 0,86 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	60±73,78	81,67±65,82	P = 0,24 (MW)
H-skóre pro D2DR (medián)	20±39,38	24,67±36,38	P = 0,91 (MW)
H-skóre pro AIP (n=31, průměr)	226,91±34,09	243,75±42,94	P = 0,23 (Studentův t-test)

Tabulka 7.10 – Analýza kategorických proměnných nádorů u mužů a u žen

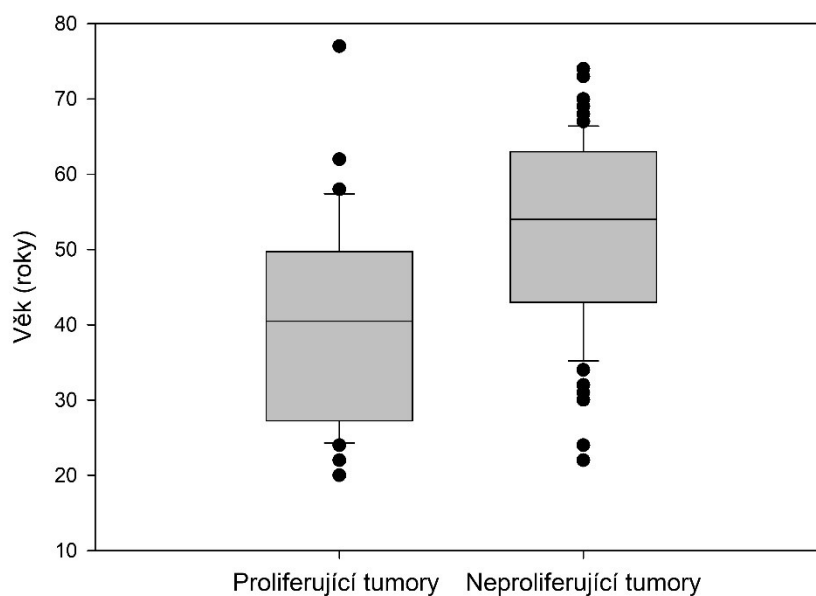
	Muži	Ženy	P-hodnota, test
Pozitivita p53			
Pozitivní	28	18	
Negativní	25	36	P = 0,07 ( $\chi^2$ )
Proliferativita			
Trouillas „A“	30	37	
Trouillas „B“	18	13	P = 0,28 (Fisherův přesný test)
Invaze			
Neinvazivní	27	28	
Invazivní	12	16	P = 0,65 (Fisherův přesný test)
Grade dle Trouillas			
1a	15	23	
2a	5	8	
1b	10	3	
2b	3	6	P = 0,09 ( $\chi^2$ )

Proliferativitu bylo možné určit celkem u 107 tumorů (75 z kategorie A a 32 z kategorie B). Zbývající tři tumory nebyly do analýzy zahrnuty. Dále bylo z analýzy vyřazeno 9 předlěčených pacientů (8 spadalo do kategorie A a jeden do kategorie B). Analyzováno bylo tedy 67 pacientů ze skupiny A a 31 pacientů ze skupiny B. Do rozboru nebyl zahrnut vlastní index Ki67, pozitivita p53 a mitotická aktivita, neboť se jedná o definující parametry kategorií. Rozdíly mezi proliferujícími a neproliferujícími tumory jsou analyzovány v tabulce 7.11. V grafu č. 7.6 jsou znázorněny rozdíly ve věku mezi pacienty s proliferujícími a neproliferujícími tumory. Rozdíly mezi invazivními a neinvazivními tumory jsou analyzovány v tabulce 7.12. Údaje o invazi byly dostupné u celkem 83 pacientů.

Rozdíly mezi jednotlivými grade systému dle Trouillas jsou uvedeny v tabulce 7.13. Kompletní údaje umožňující stanovit grade byly dostupné celkem u 80 pacientů. Z těchto případů jsme vyloučili celkem 7 pacientů po předchozí léčbě SSA a vlastní analýza tedy byla provedena u 73 případů. Z důvodu malého množství testovaných případů v jednotlivých skupinách jsme vyloučili z analýzy AIP. Jako statisticky signifikantní se jevil věk pacientů, kdy pacienti s grade 2b tumory byli signifikantně mladší než pacienti s grade 1a ( $p=0,002$ , Holm-Šidákova metoda) a s grade 2a ( $p=0,023$ , Holm-Šidákova metoda). Ostatní skupiny se mezi sebou nelišily. Signifikantně se lišily největší rozměry tumorů, kdy grade 2b tumory byly signifikantně větší než zbývající tumory ( $p=0,002-0,028$ , Holm-Šidákova metoda). Ostatní skupiny se mezi sebou nelišily. Obdobný byl výsledek pro objem tumorů, kdy se signifikantně odlišovaly pouze 2b tumory od 1b tumorů ( $p=0,037$ , test Dunnové), zatímco ostatní skupiny se mezi sebou buďto nelišily, anebo nebylo možné post-hoc analýzu

spolehlivě provést. Signifikantně nižší byla ve skupině 2b exprese SSTR2A, post-hoc analýza však neumožnila bližší analýzu mezi skupinami.

Věk pacientů s proliferujícími a neproliferujícími nádory (n=107)



Graf č. 7.6 – Rozdíl ve věku mezi pacienty s proliferujícími a neproliferujícími tumory

Tabulka 7.11 – Vliv proliferativity na klinickopatologické parametry souboru

	Trouillas A ( $\pm$ SD)	Trouillas B ( $\pm$ SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	52,70 $\pm$ 11,92	40,77 $\pm$ 13,36	<b>P = &lt;0,001</b> (Studentův t-test)
Hladina STH ( $\mu$ g/l, medián)	26,16 $\pm$ 47,53	45,77 $\pm$ 81,50	<b>P = 0,007 (MW)</b>
Hladina prolaktinu ( $\mu$ g/l, medián)	13,25 $\pm$ 352,25	18,55 $\pm$ 152,80	P = 0,42 (MW)
Hladina TSH (mIU/l, medián)	0,95 $\pm$ 1,02	1,14 $\pm$ 0,63	P = 0,23 (MW)
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, medián)	280 $\pm$ 143,40	310 $\pm$ 92,80	P = 0,61 (MW)
Největší rozměr tumoru (mm, medián)	18 $\pm$ 8,89	20 $\pm$ 10,60	P = 0,27 (MW)
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	2012,40 $\pm$ 6972,65	2766,40 $\pm$ 8239,18	P = 0,45 (MW)
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% , medián)	8 $\pm$ 28,80	3 $\pm$ 21,40	P = 0,23 (MW)
Množství $\beta$ TSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0 $\pm$ 9,87	0 $\pm$ 3,32	P = 0,97 (MW)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% , medián)	20 $\pm$ 39,80	75 $\pm$ 43,60	P = 0,11 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	142 $\pm$ 96,46	7 $\pm$ 97,54	P = 0,09 (MW)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	1,01 $\pm$ 24,56	0,67 $\pm$ 31,10	P = 0,33 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	205 $\pm$ 87,67	165 $\pm$ 84,71	P = 0,12 (MW)
H-skóre pro SSTR3 (medián)	78,50 $\pm$ 67,62	48,45 $\pm$ 72,99	P = 0,45 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	70 $\pm$ 74,30	75 $\pm$ 66,24	P = 0,96 (MW)
H-skóre pro D2DR (medián)	20 $\pm$ 35,81	28,30 $\pm$ 44,11	P = 0,66 (MW)
H-skóre pro AIP (n=22, průměr)	248,04 $\pm$ 40,76	217,50 $\pm$ 39,75	P = 0,10 (Studentův t-test)

Tabulka 7.12 – Vliv invaze tumoru na klinickopatologické parametry souboru

	Neinvazivní (±SD)	Invazivní (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	49,69±12,67	47,79±13,24	P = 0,53 (Studentův t-test)
Hladina STH (µg/l, medián)	31,51±58,91	44,18±77,76	P = 0,52 (MW)
Hladina prolaktinu (µg/l, medián)	11,96±100,69	25,75±698,2	P = 0,08 (MW)
Hladina TSH (mIU/l, medián)	1,06±1,04	0,85±0,57	P = 0,12 (MW)
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, medián)	280±145,7	320±94	P = 0,36 (MW)
Největší rozměr tumoru (mm, průměr)	17,77±6,69	22,91±9,01	<b>P = 0,005</b> <b>(Studentův t- test)</b>
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	1916,76±2284,27	2662,92±7382,72	P = 0,1 (MW)
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (%, medián)	10±25,4	9±31	P = 0,49 (MW)
Množství βTSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0±0,1	0±2,1	P = 0,32 (MW)
Množství buněk s fibrózními tělisky (% , medián)	20±40,5	35±43,5	P = 0,32 (MW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0±0,88	0±0,94	P = 0,28 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% ,průměr)	2,94±1,81	3,21±2,01	P = 0,15 (Studentův t-test)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	135±122,18	93±104,06	P = 0,17 (MW)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	2±9,59	0±32,86	P = 0,051 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	205±182,29	159,3±90,97	P = 0,09 (MW)
H-skóre pro SSTR3 (medián)	83,5±89,59	47,83±68,39	P = 0,15 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	43,33±66,82	95,17±77,88	P = 0,08 (MW)
H-skóre pro D2DR (medián)	46,67±36,25	14,17±40,75	<b>P = 0,038 (MW)</b>
H-skóre pro AIP (n=23, průměr)	248,13±33,67	226±36,89	P = 0,17 (Studentův t-test)
Pozitivita p53			
Pozitivní	23	11	
Negativní	32	15	P = 1 (Fisherův přesný test)

Tabulka 7.13 – Vliv kompletního grade dle Trouillas na klinickopatologické parametry souboru

	1a (±SD)	2a (±SD)	1b (±SD)	2b (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	50,65±12,64	57,38±7,92	48,76±13,05	37,66±10,92	<b>P = 0,003 (ANOVA)</b>
Hladina STH (µg/l, medián)	29,33±57	18,04±38,11	31,51±32,32	107,33±113,75	P = 0,13 (KW)
Hladina prolaktinu (µg/l)	11,96±31,53	15,26±87,43	11,54±192,75	31,32±17,91	P = 0,11 (KW)
Hladina TSH (mIU/l, medián)	1,06±1,14	0,78±0,76	1,06±0,85	1,15±0,32	P = 0,23 (KW)
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, medián)	250±159,1	320±81,4	310±93	240±74	P = 0,18 (KW)
Největší rozměr tumoru (mm, průměr)	18,31±6,53	19,31±9,24	16,08±6,54	28±7,74	<b>P = 0,002 (ANOVA)</b>
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	2012,4±2446,7	2043,6±6712,45	1509,3±1591,99	3781,44±8588,15	<b>P = 0,035 (KW)</b>
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% , medián)	5±27,2	15±35	10±21	5±28,1	P = 0,29 (KW)
Množství βTSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0±11,9	0±2,7	0±4,7	0±0	P = 0,25 (KW)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% , medián)	12,5±41,7	27,5±34,5	40±39,8	100±49,3	P = 0,56 (KW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	130±95,32	160±107,37	200±92,77	0±91,33	P = 0,12 (KW)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	1,86±26,97	0,01±3,57	2±4,75	0,17±57,18	P = 0,21 (KW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	206,67±88,12	208,33±93,25	206,67±52,52	100±77,22	<b>P = 0,048 (KW)</b>
H-skóre pro SSTR3 (medián)	100,08±75,04	51,57±48,4	55,17±76,93	34,17±94,89	P = 0,23 (KW)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	38,33±69,92	103,67±88,98	48,33±62,56	126,67±77,05	P = 0,24 (KW)
H-skóre pro D2DR (medián)	57,5±35,28	10,67±30,24	46,67±40,12	64,33±53,89	P = 0,14 (KW)

### 7.3.4 Analýza významu histologického subtypu tumoru

#### 7.3.4.1 Cytokeratin 18 negativní tumory

Detekce exprese cytokeratinů protilátkou CAM5.2 anebo protilátkou proti cytokeratinu 18 je součástí klasifikačního schématu WHO. Neboť se v našem souboru vyskytlo několik tumorů bez imunoreaktivity cytokeratinu 18, rozhodli jsme se v jejich případě doplnit bližší klinickopatologickou analýzu, neboť zařazení této skupiny vybočuje ze standardních klasifikačních postupů. Celkem bylo v souboru 114 tumorů identifikováno 10 cytokeratin 18-negativních tumorů (8,77 %). Ani u jednoho ze 4 pacientů s dostupnými vzorky tumorů ze dvou následných operací nebyla pozorována změna v kvalitě či kvantitě exprese oproti původnímu tumoru. Z 10 nádorů byl jediný tumor pozitivní v další provedené reakci s protilátkou proti cytokeratinům 8/18, zbývajících 9 tumorů bylo negativní (v rámci naší definice – tedy  $\leq 10$  % cytokeratin-pozitivních buněk) v reakci s oběma protilátkami a negativní byla též dodatečně provedená reakce s cytokeratinem AE1/3. Tuto skupinu (n=9, dále jen cytokeratin-negativní tumory) jsme porovnali se vzorky zbývajících pacientů (n=101). Ve skupině cytokeratin-negativních tumorů absolvoval předchozí terapii pouze jeden pacient; jednalo se o případ č.1 zmiňovaný v sekci 7.2.3. Vzhledem k tomu, že se jednalo o jediného pacienta v celém souboru léčeného neoadjuvantně pouze dopaminovým agonistou, a to pouze po krátkou dobu, nebylo možné stanovit spolehlivě vliv léčby na index Ki67, a proto jsme se rozhodli případ pro analýzu Ki67 nevyřadit. Ze samotné analýzy bylo kvůli malému počtu případů v cytokeratin-pozitivní skupině vyřazeno H-skóre pro AIP a kompletní grade dle Trouillas.. Ve skupině cytokeratin-negativních tumorů byly dostupné všechny klinické údaje s výjimkou údaje o sérové hladině STH u jediného pacienta. Výsledky srovnání jsou uvedeny v tabulce 7.14. Analýza proliferativity byla opět provedena po vyřazení předléčených pacientů.

Vzhledem k tomu, že je exprese cytokeratinů využívána jako důležitý klasifikační prvek, jenž vymezuje skupinu SGST, která dle většiny studií vyznačuje agresivnějším chováním (viz sekce 4.5.3), rozhodli jsme se dále porovnat skupinu cytokeratin-negativních tumorů s podskupinou SGST (n=41) a non-SGST (n=60) tumorů, neboť tyto dvě kategorie jsou definovány právě expresí cytokeratinů. Jako statisticky signifikantní se v této analýze jevila exprese p53, jež byla pozorována častěji ve skupině SGST tumorů ve srovnání s ostatními dvěma skupinami ( $p=0,022$ ,  $\chi^2$ ). Skupina cytokeratin-negativních tumorů vykazovala signifikantně nižší expresi E-cadherinu ve srovnání se skupinou non-SGST, nikoliv však SGST (Kruskal-Wallisův test,  $p=0,065$ , test Dunnové  $p=0,006$ ). Exprese SSTR2A byla u

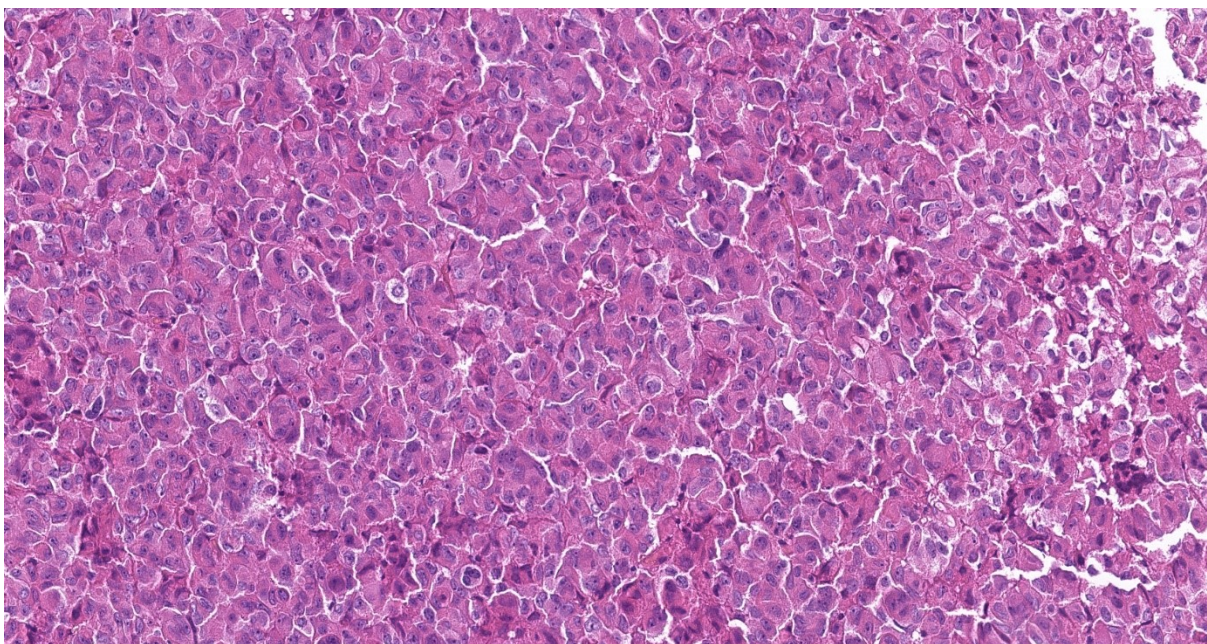


cytokeratin-negativních tumorů signifikantně vyšší ve srovnání s SGST, neodlišovala se však od non-SGST (ANOVA,  $P = <0,001$ , Holm-Šidákova metoda  $p=0,009$  pro cytokeratin-negativní versus SGST).

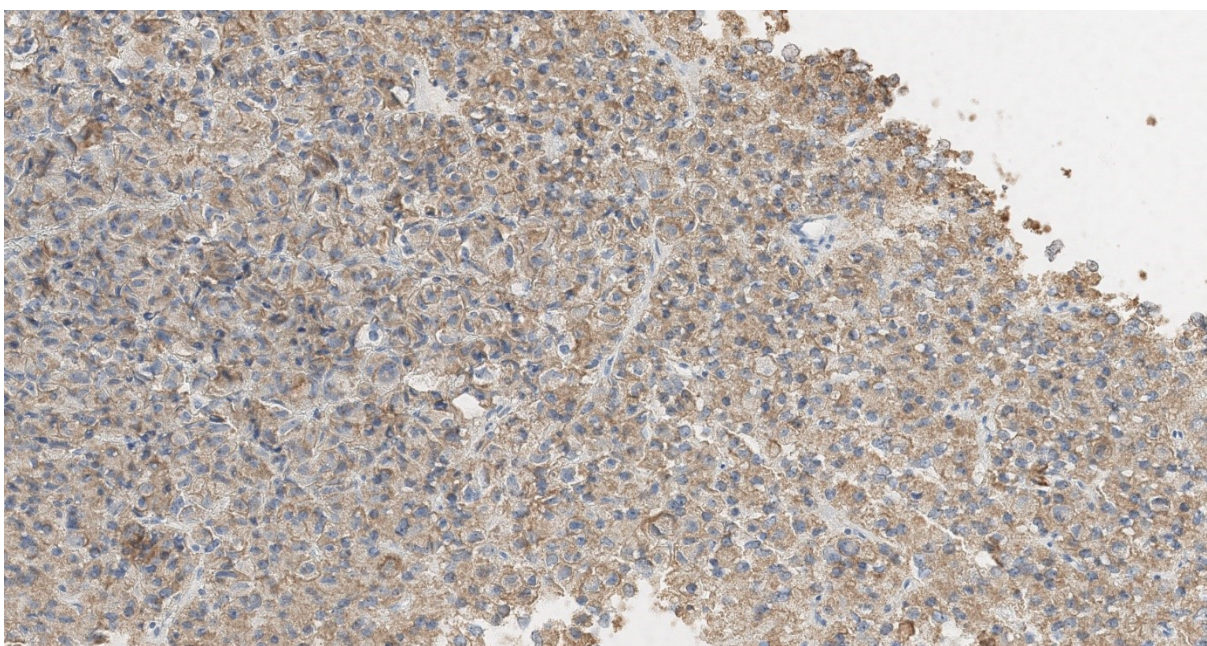
Vzhledem k absenci klinických odlišností mezi skupinou cytokeratin-negativních tumorů a zbytkem souboru jsme se rozhodli pro účely další analýzy cytokeratin-negativní nádory dále zrušit jako samostatnou skupinu a tyto nádory přiřadit do stávajících histologických kategorií. Za tímto účelem jsme se rozhodli přihlídnout k morfologii, expresi STH a také k expresi E-cadherinu (viz sekce 7.3.4.3). Jak vyplývá z tabulky 7.15 a také z další morfoloické analýzy (viz níže), cytokeratin negativní skupina tumorů měla heterogenní charakter. Dva tumory (č. 6 a č. 8) měly morfoloický charakter DGST (obrázek 7.1) se silnou difúzní expresí STH (obrázek 7.2) a rozhodli jsme se je tedy takto klasifikovat i přes absenci exprese E-cadherinu u tumoru č. 8. Příklad č. 3 měl morfoloický charakter smíšeného somatotropního/laktotropního tumoru se dvěma odlišnými populacemi tvořenými menšími chromofobními buňkami s převažující expresí prolaktinu a většími eosinofilními buňkami s převažující expresí STH. Tento nádor jsme tedy klasifikovali jako SLT. Jednalo se o jediný případ z celého souboru předlčený pouze DA (tj. případ č. 1 z tabulky 7.6). Jako SLT jsme klasifikovali též případy č. 7 a č. 9: případ č. 7 byl tvořen celulárními difúzními partiemi relativně uniformních, menších, chromofobních buněk, jež se střídaly s oblastmi s výraznější perivaskulární hyalinizací. Buňky exprimovaly silně prolaktin i STH. Příklad č. 9 byl difúzně uspořádaný tumor tvořený směsí menších chromofobních buněk a objemnějších eosinofilních buněk, opět s koexpresí prolaktinu a STH. Tumor č. 5 byl klasifikován jako SGST: nádor byl tvořen drobnými dyskohezivními chromofobními buňkami s ojedinělými přimíšenými elementy s eosinofilní cytoplazmou. V bezprostředním okolí byla patrná hyalinizace stromatu přecházející volně do komprimované stromální kostry okolní hypofýzy. Nádor neexprimoval E-cadherin ani GATA3.

Tabulka 7.14 – Vliv absence exprese cytokeratinu 8/18 na vlastnosti zkoumaných tumorů.

	CK8/18 <sup>+</sup> (±SD)	CK8/18 <sup>-</sup> (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	48,11±13,57	49,11±14,88	P = 0,833 (Studentův t-test)
Hladina STH (µg/l, medián)	31,51±55,18	32,07±125,47	P = 0,92 (MW)
Hladina prolaktinu (µg/l, medián)	16,39±485,40	13,25±101,24	P = 0,92 (MW)
Hladina TSH (mIU/l, medián)	0,94±0,91	0,98±0,53	P = 0,75 (MW)
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, medián)	288,30±134	310±81,70	P = 0,90 (MW)
Největší rozměr tumoru (mm, medián)	19±9,43	24±7,85	P = 0,48 (MW)
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	2068,56±7530,48	3157,44±2234,24	P = 0,63 (MW)
Množství prolaktin imunoaktivních buněk (% , medián)	5±25,90	3±32,30	P = 0,87 (MW)
Množství βTSH imunoaktivních buněk (% , medián)	0±8,26	0±1,60	P = 0,87 (MW)
Množství Ki67 imunoaktivních buněk (% , medián)	2,91±1,92	2,15±2,05	P = 0,49 (MW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0±0,78	0±1,86	P = 0,97 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	125±96,90	0±92,68	P = 0,19 (MW)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	1,33±26,46	0,01±0,99	P = 0,08 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	173,33±88,11	190±63,19	P = 0,59 (MW)
H-skóre pro SSTR3 (medián)	63,03±64,86	51,56±99,68	P = 0,84 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	75±67,13	70±99,60	P = 0,79 (MW)
H-skóre pro D2DR (medián)	24,33±38,26	13±30,94	P = 0,62 (MW)
Proliferativita			
Trouillas A	61	6	
Trouillas B	29	2	P=1 (Fisherův přesný test)
Expres p53			
Pozitivní	42	3	
Negativní	48	5	P=0,72 (Fisherův přesný test)
Invaze			
Neinvazivní	50	5	
Invazivní	24	4	P=0,48 (Fisherův přesný test)

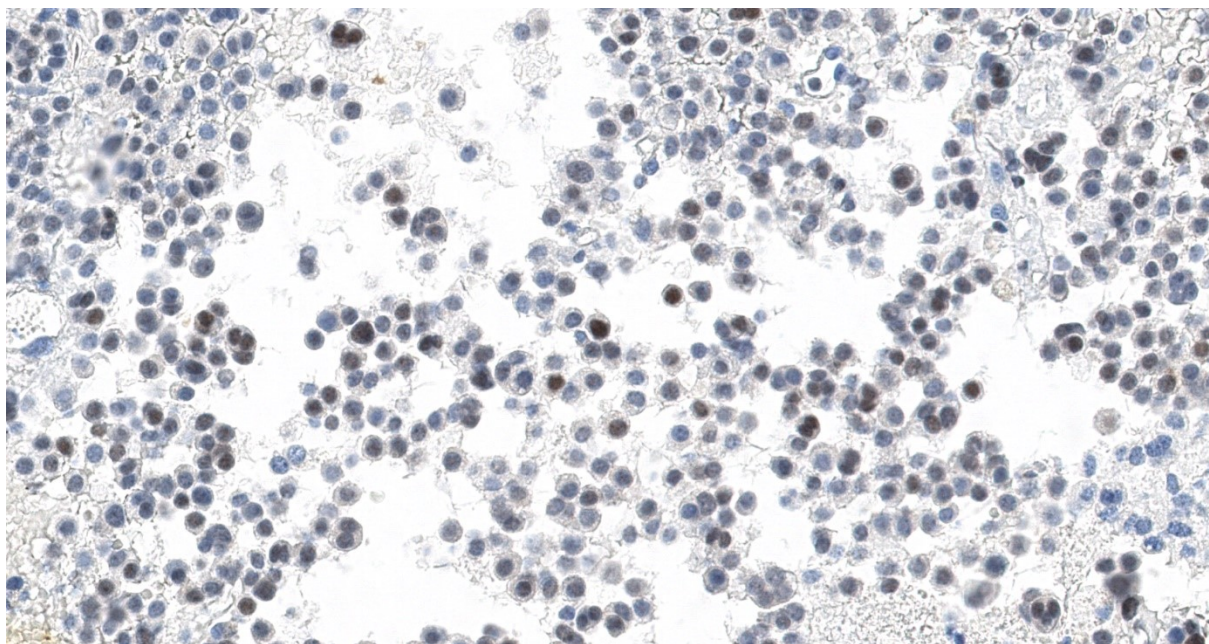


Obrázek 7.1 – Tumor č. 6 z tabulky 5.14, klasifikovaný vzhledem k morfologii a expresi STH jako DGST i přes absenci perinukleární exprese cytokeratinu 18 (H&E, 200x zvětšení)

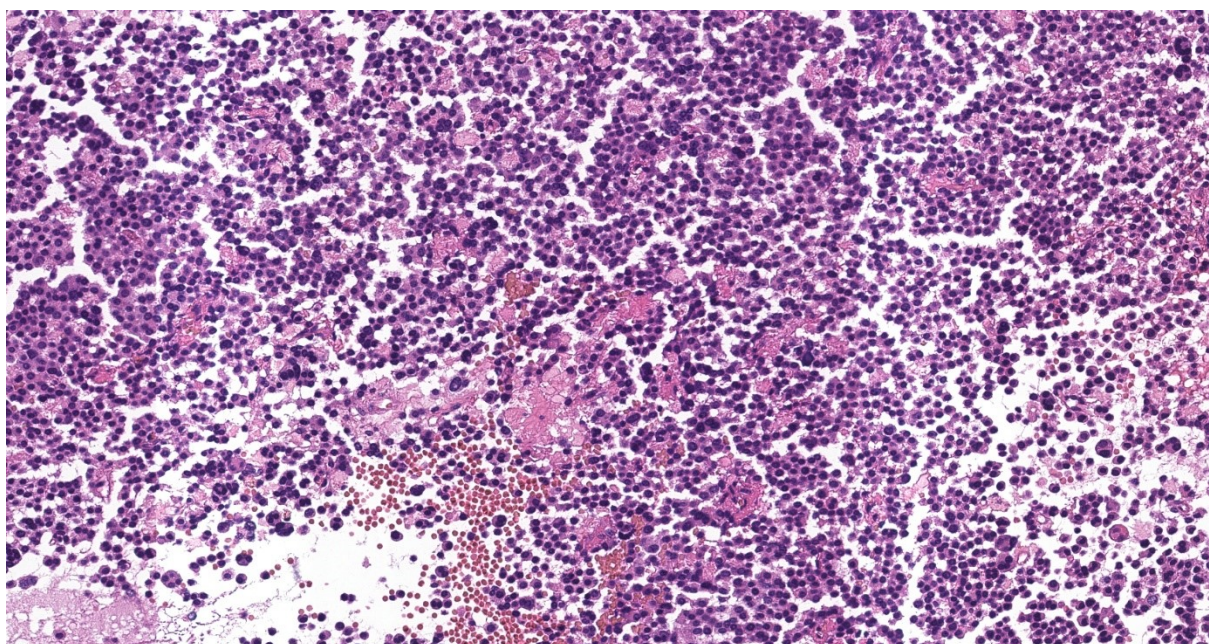


Obrázek č. 7.2 – Expres STH v tumoru č. 8 z tabulky 5.14, jenž byl klasifikován jako DGST i přes absenci perinukleární exprese cytokeratinu 18.(STH imunohistochemie, 200x zvětšení)





Obrázek 7.3 – Tumor č. 2 z tabulky 5.14, v tumoru byla přítomná slabá exprese GATA3, jež spolu s morfoloickým nálezem umožnila tumor klasifikovat jako PPPT (GATA3 imunohistochemie, 400x zvětšení)



Obrázek 7.4 – Tumor č. 1 z tabulky 5.14, jenž byl klasifikován jako PPPT na podkladě morfologie a fokální exprese  $\beta$ TSH (H&E, 200x zvětšení)

Přesná klasifikace zbývajících tumorů (č. 1, 2 a 4) byla obtížná: ve všech třech případech bylo možné identifikovat ojedinělé  $\beta$ TSH pozitivní buňky (1 % v tumoru č. 1, < 1% v tumoru č. 2 a 5 % v tumoru č. 4). Morfologie nádorů byla obdobná: jednalo se o difúzně rostoucí tumory s malými dyskohezivními chromofobními buňkami, ojedinělými většími eosinofilními

buňkami a chybějící expresí E-cadherinu. V tumoru č. 4 bylo přítomno 5 % buněk s pozitivitou cytokeratinu ve formě fibrózních tělísek. Tumor č. 2 exprimoval v rozptýlených buňkách slabě GATA3 (obrázek 7.3), zbývající dva tumory byly GATA3 negativní. Dle morfologického a imunohistochemického profilu tedy tyto tři tumory odpovídaly jednotce plurihormonálního Pit1<sup>+</sup> tumoru (obrázek 7.4). Další smysluplné statistické srovnání této podskupiny nebylo vzhledem k množství případů možné a pro následující část práce jsme se tedy rozhodli tyto nádory analyzovat společně se skupinou SGST. Autor se domnívá, že vzhledem k literárně udávanému klinicky agresivnímu chování obou jednotek (SGST i plurihormonálního Pit1<sup>+</sup> tumor), k absenci přesně stanovené definice jednotky plurihormonálního Pit1<sup>+</sup> tumoru v případě klinicky funkčních tumorů a k nízké expresi E-cadherinu vysoce charakteristické v našem souboru pro podskupinu SGST (viz 7.3.4.3) je tento postup ospravedlnitelný.

Tabulka 7.15 – Vybrané klinickopatologické charakteristiky cytokeratin-negativních tumorů (údaje STH, prolaktin a  $\beta$ TSH charakterizují množství imunoreaktivních buněk)

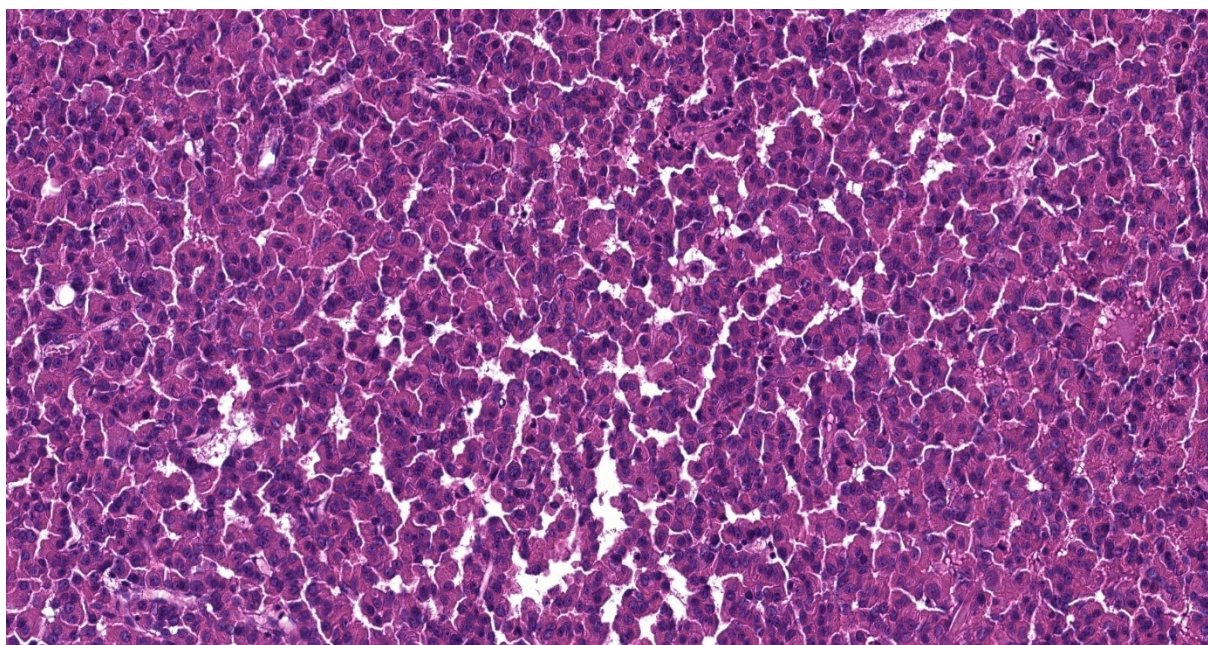
	Pohlaví	Věk	STH (% buněk)	Prolaktin (% buněk)	E-cadherin (H-skóre)	SSTR2A (H- skóre)	Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk)	Invaze	Průměr (mm)	Konečná klasifikace
Případ č. 1	Muž	63	20 %	15 %	0	215	342	Ano	20	Plurihormonální Pit1 <sup>+</sup> tumor
Případ č. 2	Žena	64	25 %	3 %	0	190	310	Ne	30	Plurihormonální Pit1 <sup>+</sup> tumor
Případ č. 3	Muž	44	60 %	90 %	102	155,33	340	Ano	28	SLT
Případ č. 4	Muž	24	15 %	0 %	0	163,33	383,6	Ano	17	Plurihormonální Pit1 <sup>+</sup> tumor
Případ č. 5	Muž	41	60 %	1 %	0	51,67	120	Ne	5	SGST
Případ č. 6	Muž	32	100 %	1 %	212	235	220	Ano	24	DGST
Případ č. 7	Žena	50	80 %	60 %	205	266,67	350	Ne	25	SLT
Případ č. 8	Žena	60	95 %	2 %	0	234,67	290	Ne	25	DGST
Případ č. 9	Žena	64	80 %	10 %	140	168,33	250	Ne	14	SLT



#### 7.3.4.2 Patologické charakteristiky jednotlivých histologických subtypů nádorů

Následující sekce shrnuje patologické charakteristiky 114 tumorů od 110 pacientů. V případě 4 dostupných vzorků z reoperací nedošlo ani v jednom případě ke změně patologického subtypu mezi primárním a reoperovaným tumorem. V následující analýze byly zpracovány pouze patologické údaje o tumorech z primooperací, jež dle názoru autora mnohem lépe ilustrují přirozené biologické vlastnosti souboru. Klinické charakteristiky jednotlivých subtypů jsou dále diskutovány v sekci 7.3.4.6.

V souboru 110 tumorů bylo pro následující rozbor 45 nádorů klasifikováno jako SGST (41 %, včetně tří plurihormonálních Pit1<sup>+</sup> tumorů), 29 jako DGST (26 %), 26 jako SLT (24 %) a 10 jako plurihormonální tumory (9 %). Reprezentativní příklady jednotlivých nádorových subtypů jsou znázorněny na obrázcích 7.5 – 7.8.

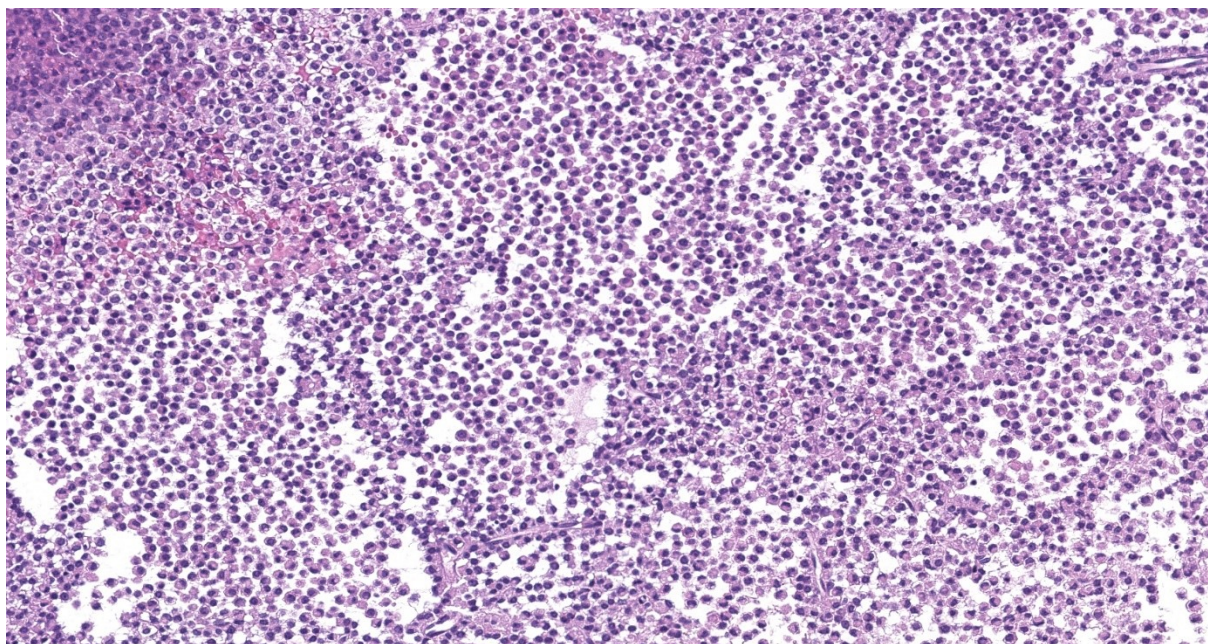


Obrázek 7.5 – Tumor ze skupiny DGST (H&E, 200x zvětšení)

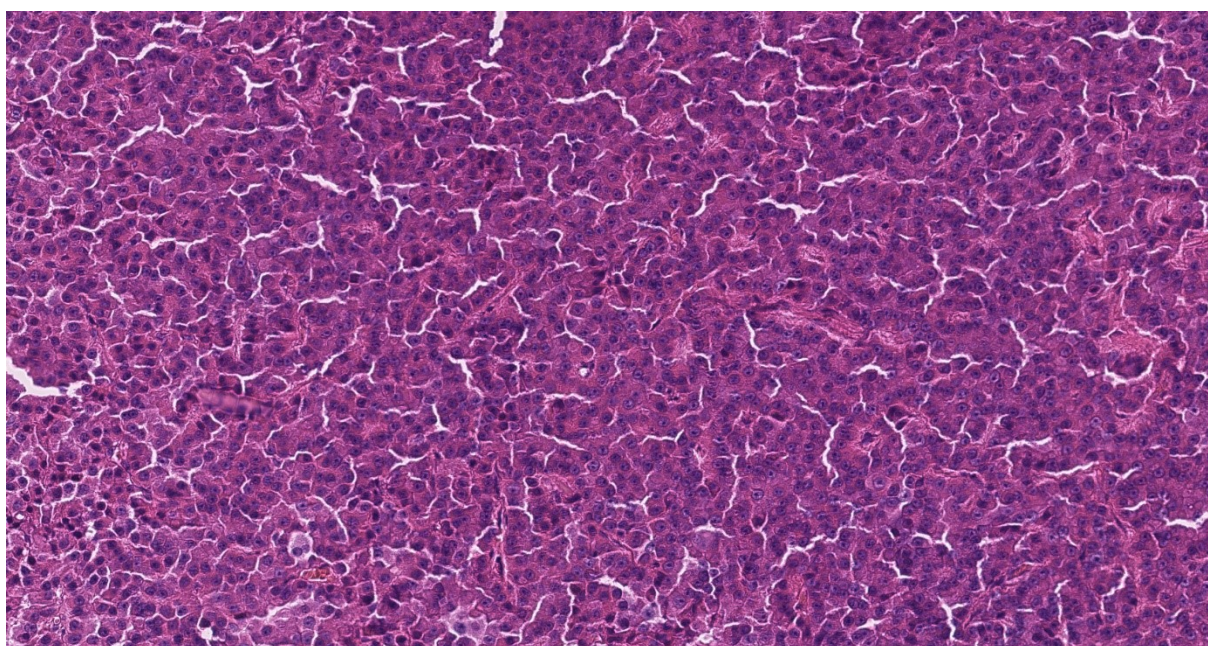
Všechny hodnocené patologické parametry byly dostupné u všech tumorů s výjimkou mitotického indexu, jenž nebylo možné určit u 8 tumorů (n=5 ve skupině SGST, n=2 ve skupině DGST, n=1 ve skupině SLT), exprese p53, již nebylo možné určit u 3 tumorů (n=2 ve skupině SGST a n=1 ve skupině DGST) a proliferativity stanovené dle gradingového schématu Trouillas, již nebylo možné určit u 3 tumorů (n=2 ve skupině SGST a n=1 ve skupině SLT). Exprese AIP byla stanovena v 31 případech, z toho 17 patřilo do skupiny SGST, 4 patřily do skupiny DGST, 9 do skupiny SLT a 1 do skupiny plurihormonálních tumorů. V podskupině s neoadjuvantní léčbou SSA (n=9) bylo celkem 5 SGST, 2 DGST a 2



SLT: tyto případy byly následně vyloučeny pro analýzu Ki67 a proliferativity z dříve diskutovaných důvodů. Patologické parametry jednotlivých podskupin byly testovány celkem třikrát: nejprve jsme porovnali skupinu SGST (n=45) a non-SGST (n=65, tabulka 7.16, graf č. 7.7), dále jednotlivé podskupiny non-SGST (tabulky 7.17 a 7.18) a poté jsme porovnali všechny 4 kategorie (tabulka 7.19 a 7.20, graf č. 7.8). Ze srovnání podskupin non-SGST a všech subtypů jsme vyřadili AIP, neboť v kategorii plurihormonálních tumorů byl údaj dostupný pouze v jednom případě.

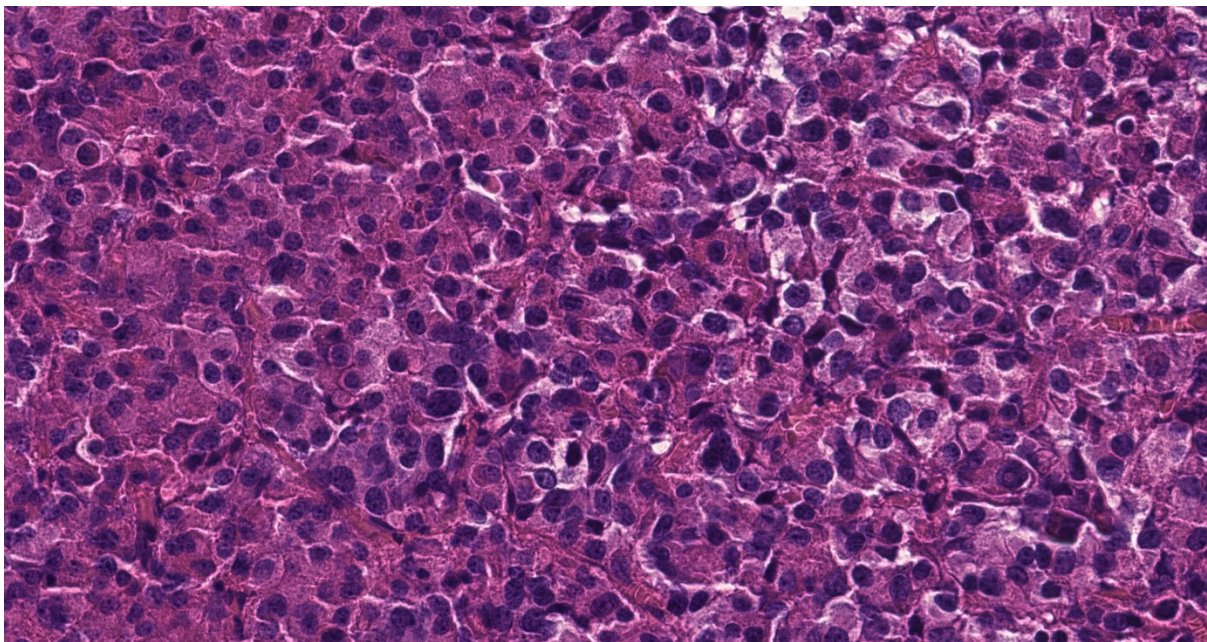


Obrázek 7.6 – Tumor ze skupiny SGST (H&E, 200x zvětšení)



Obrázek 7.7 – Tumor ze skupiny plurihormonálních nádorů (H&E, 200x zvětšení)





Obrázek 7.8 - Tumor ze skupiny SLT. V levé části obrázku je patrná populace buněk s objemnou eosinofilní cytoplasmou, jež by v imunohistochemickém průkazu STH byly pozitivní. V pravé části je populace menších a chromofobních buněk, jež by exprimovala prolaktin (H&E, 400x zvětšení)

Podskupina non-SGST tumorů se mezi sebou odlišovala jednak svými definujícími parametry (tedy množstvím prolaktin a  $\beta$ TSH imunoreaktivních buněk) a dále pak množstvím fibrózních tělísek a expresí SSTR3. V případě fibrózních tělísek ukázal post-hoc analýza testem Dunnové signifikantně vyšší množství fibrózních tělísek ve skupině SLT v porovnání s DGST ( $p=0,001$ ), nikoliv však mezi skupinou plurihormonálních tumorů a zbývajících dvěma skupinami. Expresí SSTR3 hodnocená post-hoc Holm-Šidákovou metodou prokázala signifikantně vyšší expresi SSTR3 ve skupině DGST ve srovnání se skupinou SLT ( $p=0,029$ ), rozdíl však nebyl patrný mezi skupinou plurihormonálních tumorů a zbývajících dvěma skupinami. Další rozdíly mezi podskupinami nebyly pozorovány.

Tabulka 7.16 – Srovnání patologických parametrů skupiny SGST a non-SGST

	SGST (±SD)	Non-SGST (±SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% , medián)	5±21,60	10±28,70	P=0,29 (MW)
Množství βTSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0±4,09	0±9,74	P=0,69 (MW)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% , medián)	100±21	7,50±20	<b>P&lt;0,001 (MW)</b>
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , medián)	3,29±2,03	2,87±1,86	P=0,31 (MW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0±0,63	0±0,88	P=0,09 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	0±39,55	172±65,79	<b>P&lt;0,001 (MW)</b>
H-skóre pro SSTR1 (medián)	0,34±9,11	2±31,73	<b>P=0,029 (MW)</b>
H-skóre pro SSTR2A (průměr)	113,09±79,44	209,04±67,16	<b>P&lt;0,001 (Studentův t-test)</b>
H-skóre pro SSTR3 (medián)	35,21±36,71	88,53±75,31	<b>P&lt;0,001 (MW)</b>
H-skóre pro SSTR5 (medián)	102±71,70	43,67±63,90	<b>P&lt;0,002 (MW)</b>
H-skóre pro D2DR (medián)	15±32,31	28,30±40,73	P=0,24 (MW)
H-skóre pro AIP (n=31, průměr)	227,21±37,88	243,39±38,99	P=0,25 (Studentův t-test)
Proliferativita			
Trouillas A	22	45	
Trouillas B	16	15	P=0,12 ( $\chi^2$ )
Invaze			
Neinvazivní	17	38	
Invazivní	14	14	P=0,14 ( $\chi^2$ )
Exprese p53			
Pozitivní	24	22	
Negativní	19	42	<b>P = 0,046 (<math>\chi^2</math>)</b>
Grade dle Trouillas			
1a	12	26	
2a	4	9	
1b	3	10	
2b	6	3	P=0,16 ( $\chi^2$ )

Tabulka 7.17 – Srovnání patologických parametrů DGST, SLT a plurihormonálních tumorů

	DGST ( $\pm$ SD)	SLT ( $\pm$ SD)	Plurihormonální tumory ( $\pm$ SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% , medián)	1 $\pm$ 14,70	45 $\pm$ 28,30	17,50 $\pm$ 20	<b>P&lt;0,001 (KW)</b>
Množství $\beta$ TSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0 $\pm$ 0,31	0 $\pm$ 0,33	10 $\pm$ 16,50	<b>P&lt;0,001 (KW)</b>
Množství buněk s fibrózními tělísky (% , medián)	0 $\pm$ 9,17	25 $\pm$ 22	12,50 $\pm$ 18,50	<b>P=0,001 (KW)</b>
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , medián)	2,15 $\pm$ 1,99	3,10 $\pm$ 1,76	2,91 $\pm$ 1,65	P=0,16 (KW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0 $\pm$ 0,54	0 $\pm$ 1,19	0 $\pm$ 0,30	P=0,87 (KW)
H-skóre pro E- cadherin (průměr)	166,52 $\pm$ 68,92	182,42 $\pm$ 65,09	167,60 $\pm$ 61,69	P=0,16 (ANOVA)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	2,05 $\pm$ 44,35	3,50 $\pm$ 15,56	1,33 $\pm$ 6,56	P=0,87 (KW)
H-skóre pro SSTR2A (průměr)	224,39 $\pm$ 66,14	204,23 $\pm$ 57,42	177,03 $\pm$ 85,67	P=0,14 (ANOVA)
H-skóre pro SSTR3 (průměr)	123,55 $\pm$ 85,13	71,38 $\pm$ 53,28	95,61 $\pm$ 75,82	<b>P=0,034 (ANOVA)</b>
H-skóre pro SSTR5 (medián)	81,67 $\pm$ 66,06	37,50 $\pm$ 52,92	71 $\pm$ 82,01	P=0,63 (KW)
H-skóre pro D2DR (medián)	16,67 $\pm$ 42,13	47,50 $\pm$ 33,32	54,58 $\pm$ 52,73	P=0,24 (KW)

Tabulka 7.18 - Srovnání patologických parametrů skupiny SGST a non-SGST pro kategorické proměnné

	DGST	SLT	Plurihormonální tumory	P-hodnota, test
Proliferativita				
Trouillas A	21	17	7	
Trouillas B	6	6	3	P=0,88 ( $\chi^2$ )
Exprese p53				
Pozitivní	18	17	7	
Negativní	10	9	3	P = 0,95 ( $\chi^2$ )
Invaze				
Neinvazivní	14	18	6	
Invazivní	7	6	1	P = 0,59 ( $\chi^2$ )
Grade dle Trouillas				
1a	13	10	3	
2a	3	5	1	
1b	1	6	3	
2b	3	0	0	P = 0,12 ( $\chi^2$ )

Při srovnání všech histologických subtypů byl patrný očekávaný signifikantní statistický rozdíl v parametrech definujících jednotlivé kategorie (imunoreaktivita prolaktinu,  $\beta$ TSH, množství fibrózních tělísek) v rámci post hoc analýzy (test Dunnové  $p < 0,001$  pro množství buněk s fibrózními tělisky, prolaktinem a  $\beta$ TSH). V této datové sestavě neprokázal Dunnové test signifikantní rozdíl v množství fibrózních tělísek mezi SLT a DGST ( $p = 0,18$ ). Výsledky post-hoc analýzy pro E-cadherin v podstatě kopírovaly výsledky statistické analýzy v tabulce 7.15 a jednotlivé podskupiny non-SGST se mezi sebou neodlišovaly. Exprese SSTR2A byla signifikantně nižší v SGST ve srovnání s SLT a DGST ( $p < 0,001$ , Dunnové test), nikoliv však ve srovnání s plurihormonálními tumory ( $p = 0,33$ , Dunnové test). Exprese SSTR3 byla ve srovnání s SGST signifikantně vyšší u DGST ( $p < 0,001$ , Dunnové test), nikoliv však u plurihormonálních tumorů ( $p = 0,22$  Dunnové test). Exprese SSTR5 byla signifikantně vyšší u SGST ve srovnání s SLT ( $p = 0,009$ , Dunnové test), nelišila se však signifikantně od exprese v plurihormonálních tumorech. Post hoc analýza nebyla schopna spolehlivě stanovit rozdíly v expresi SSTR3 mezi SGST a SLT a v expresi SSTR5 mezi SGST a DGST. Z těchto důvodů jsme otestovali v těchto dvou případech data separátně: zatímco v expresi SSTR5 nebyl přítomen signifikantní rozdíl (DGST x SGST,  $p = 0,06$ , Mann-Whitneyův test), analýza prokázala signifikantně vyšší expresi SSTR3 v SLT (SGST x SLT,  $p = 0,028$ , Mann-Whitneyův test). Vzhledem ke kontextu (vícečetné testování 6 hypotéz o rozdílných vlastnostech jednotlivých podskupin) jsme v tomto případě provedli dodatečně Bonferroniho

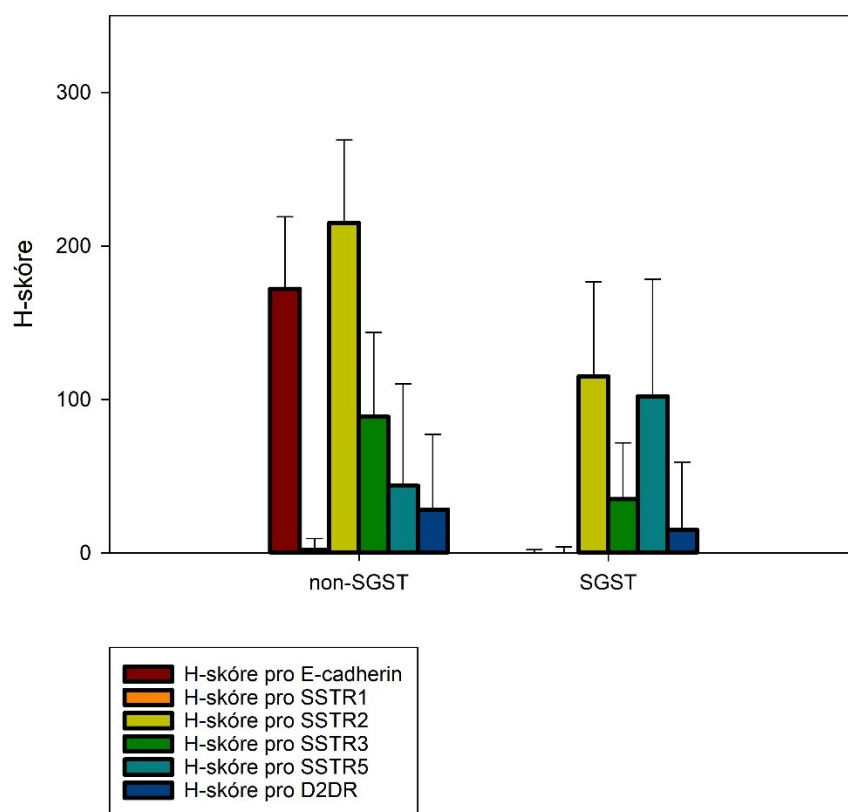
korekci p-hodnoty ( $p_{\text{korigované}} = \alpha/m$ , kde  $\alpha = 0,05$  a  $m$  = počet testovaných hypotéz), jež v této situaci odpovídalo 0,008. Z těchto důvodů jsme rozdíl nepovažovali za statisticky signifikantní.

Z výše uvedeného lze shrnout, že po patologické stránce se skupina SGST od ostatních podskupin lišila v největším počtu charakteristik. Skupina non-SGST tumorů se nicméně nechovala zcela homogenně a určitou blízkost k SGST vykazovaly především plurihormonální tumory, jež se od SGST neodlišovaly v expresi SSTR2A, SSTR3 a SSTR5. Skupina SLT se od SGST nelišila v expresi SSTR3 a skupina DGST se signifikantně neodlišovala expresí SSTR5. Uvnitř non-SGST skupiny jsme zaznamenali vyšší frekvenci fibrózních tělísek u SLT ve srovnání s DGST a dále pak vyšší expresi SSTR3 v DGST ve srovnání se SLT. Konzistentní byla statisticky odlišná (vyšší) exprese E-cadherinu ve skupině non-SGST.

Tabulka 7.19 - Srovnání patologických parametrů jednotlivých histologických subtypů pro kategorické proměnné

	SGST	DGST	SLT	Plurihormonální tumory	P-hodnota, test
Proliferativita					
Trouillas A	22	21	17	7	
Trouillas B	16	6	6	3	P=0,34 ( $\chi^2$ )
Exprese p53					
Pozitivní	24	18	17	7	
Negativní	19	10	9	3	P = 0,77 ( $\chi^2$ )
Invaze					
Neinvazivní	17	14	18	6	
Invazivní	14	7	6	1	P = 0,28 ( $\chi^2$ )
Grade dle Trouillas					
1a	12	13	10	3	
2a	4	3	5	1	
1b	3	1	6	3	
2b	6	3	0	0	P = 0,12 ( $\chi^2$ )

# H-skóre jednotlivých proteinů ve skupině SGST a non-SGST

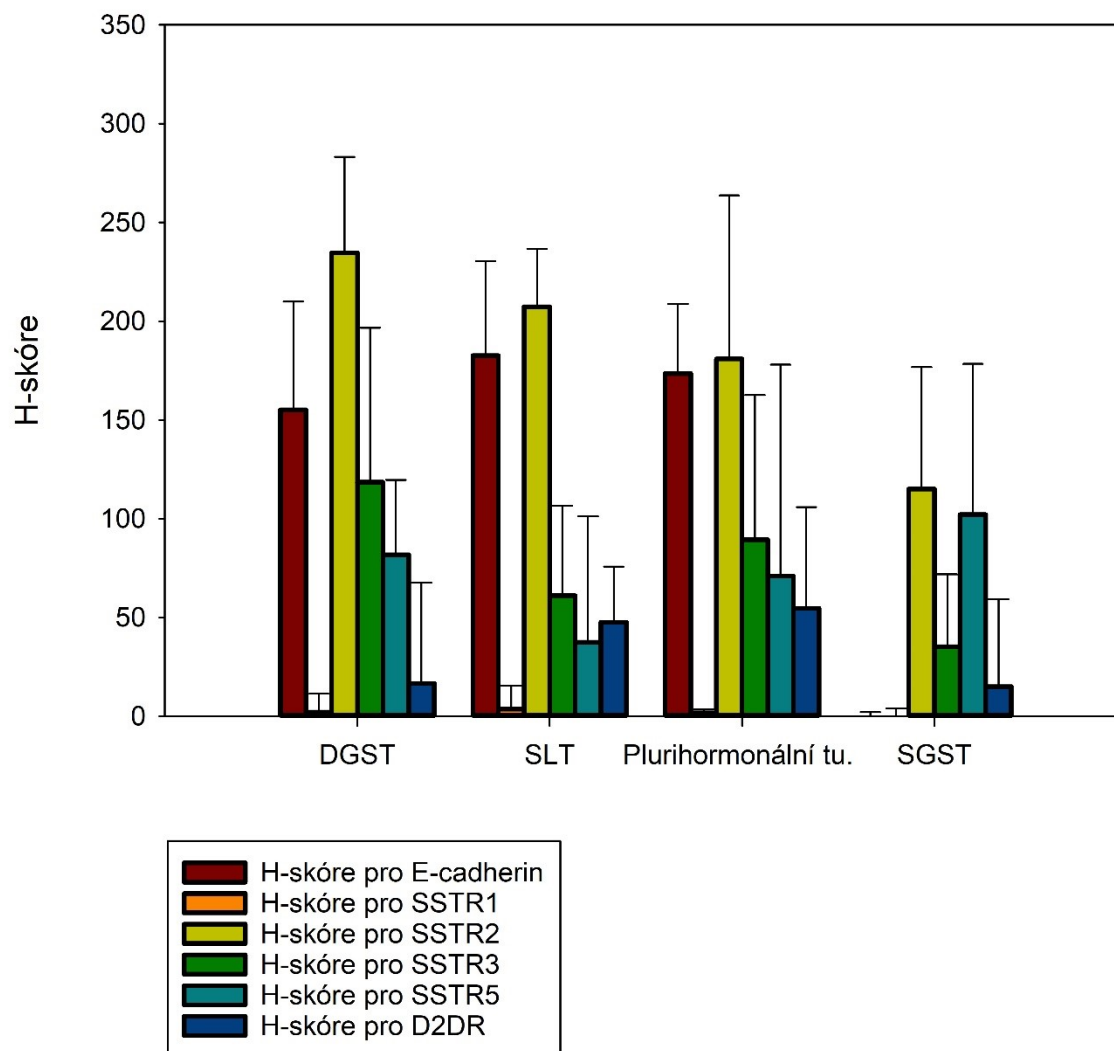


Graf č. 7.7 – Rozdíly H-skóre jednotlivých proteinů mezi skupinami SGST a non-SGST

Tabulka 7.20 – Srovnání patologických parametrů SGST, DGST, SLT a plurihormonálních tumorů

	SGST (±SD)	DGST (±SD)	SLT (±SD)	Plurihormonální tumory (±SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% (%, medián)	5±21,60	1±14,70	45±28,30	17,50±20	<b>P &lt;0,001 (KW)</b>
Množství βTSH imunoreaktivních buněk (% (%, medián)	0±4,09	0±0,31	0±0,33	10±16,50	<b>P &lt;0,001 (KW)</b>
Množství buněk s fibrózními tělisky (% (%, medián)	100±21	0±9,17	25±22	12,50±18,50	<b>P &lt;0,001 (KW)</b>
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% (%, medián)	3,29±2,03	2,15±1,99	3,10±1,76	2,91±1,65	P = 0,20 (KW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0±0,63	0±0,54	0±1,19	0±0,30	P = 0,36 (KW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	0±39,55	155±68,92	182,50±65,09	173,50±61,69	<b>P &lt;0,001 (KW)</b>
H-skóre pro SSTR1 (medián)	0,34±9,11	2,05±44,35	3,50±15,56	1,33±6,56	P = 0,13 (KW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	115±79,44	234,67±66,14	207,33±57,42	180,83±85,67	<b>P &lt;0,001 (KW)</b>
H-skóre pro SSTR3 (medián)	35,21±36,71	118,37±85,13	60,98±53,28	89,33±75,82	<b>P &lt;0,001 (KW)</b>
H-skóre pro SSTR5 (medián)	102±71,70	81,67±66,06	37,50±52,92	71±82,01	<b>P = 0,012 (KW)</b>
H-skóre pro D2DR (medián)	15±32,31	16,67±42,13	47,50±33,32	54,58±52,73	P = 0,22 (KW)

# H-skóre jednotlivých proteinů ve skupinách jednotlivých nádorových subtypů



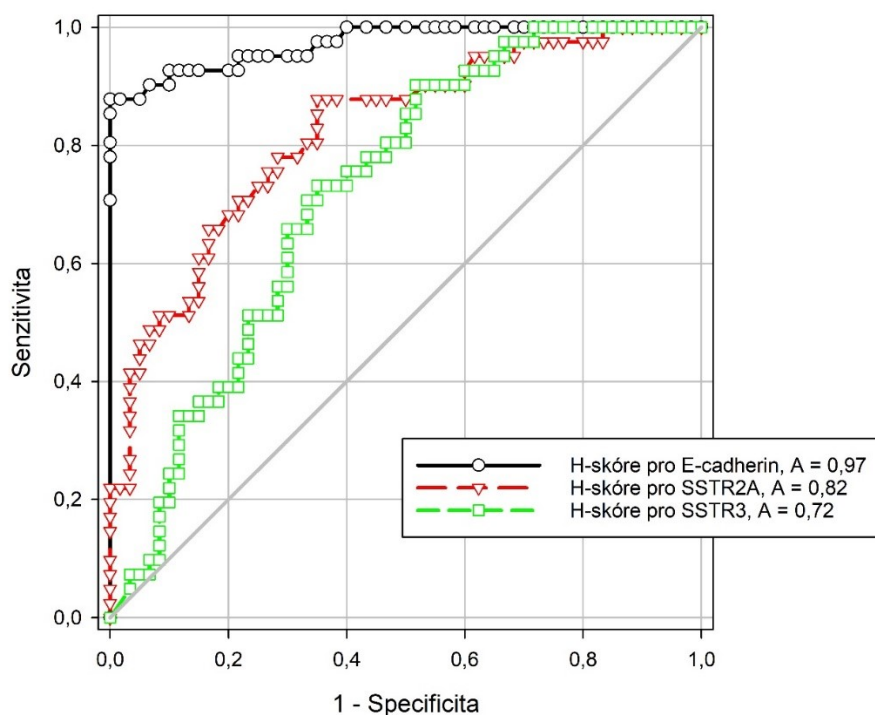
Graf č. 7.8 - Rozdíly H-skóre jednotlivých proteinů mezi jednotlivými histologickými podtypy tumorů



#### 7.3.4.3 Analýza ROC-křivek pro SSTR2A, SSTR3, SSTR5 a E-cadherin ve skupině SGST a non-SGST

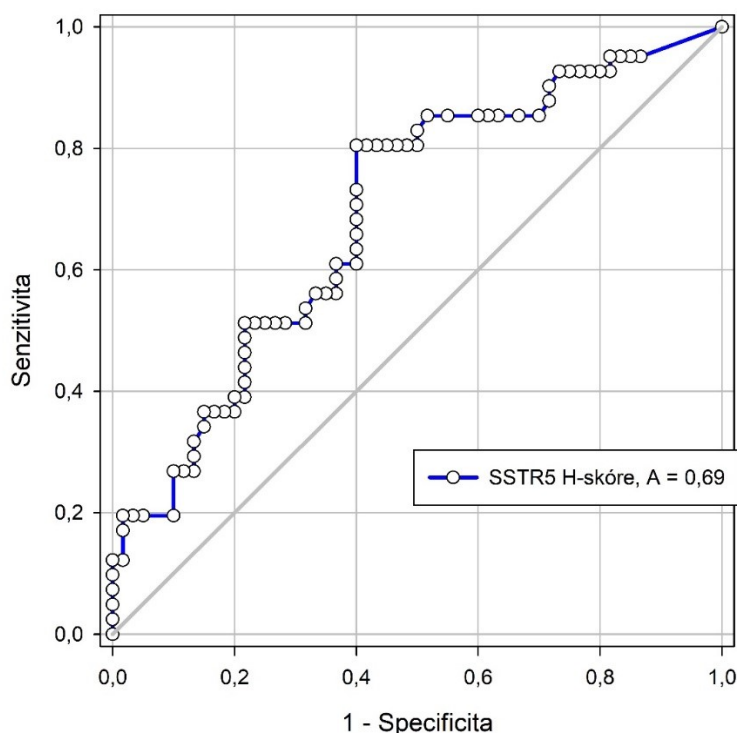
Na podkladě literárních údajů o odlišné expresi SSTR2A, SSTR5 a E-cadherinu v SGST (viz sekce 4.6.7 a 4.8.3) a též vzhledem k výsledkům v sekci 7.3.4.2 jsme se rozhodli posoudit senzitivitu a specifitu exprese těchto proteinů prostřednictvím ROC-křivek. Pro tuto analýzu byly vyloučeny cytokeratin-negativní tumory ( $n=9$ ), neboť jejich zařazení bylo provedeno mimo standardní klasifikační rámec. Analyzováno tedy bylo celkem 41 SGST a 60 non-SGST. ROC křivky pro E-cadherin, SSTR2A a SSTR3 jsou znázorněny v grafu č. 7.9, křivka pro SSTR5 pak v grafu č. 7.10. Z těchto tří parametrů se v ROC analýze jako nejcharakterističtější pro SGST ukázala exprese E-cadherinu ( $AUC=0,97$ ,  $p<0,0001$ ) následovaná expresí SSTR2A ( $AUC=0,82$ ,  $p<0,0001$ ) a SSTR3 ( $AUC=0,72$ ,  $p=0,0001$ ), přičemž statistický rozdíl mezi křivkami E-cadherinu a SSTR2A byl signifikantní ( $p<0,001$ ), obdobně jako mezi křivkami E-cadherinu a SSTR3 ( $p<0,0001$ ). Signifikantní nebyl rozdíl mezi křivkou SSTR2A a SSTR3 ( $p=0,09$ ). Exprese SSTR5 vykazovala ve srovnání s E-cadherinem a SSTR2A nejhorší senzitivitu a specifitu ( $AUC=0,69$ ,  $p=0,001$ ).

ROC křivky pro E-cadherin, SSTR2 a SSTR3



Graf č. 7.9 – ROC křivky pro SSTR2A, SSTR3 a E-cadherin

ROC křivka - SSTR5

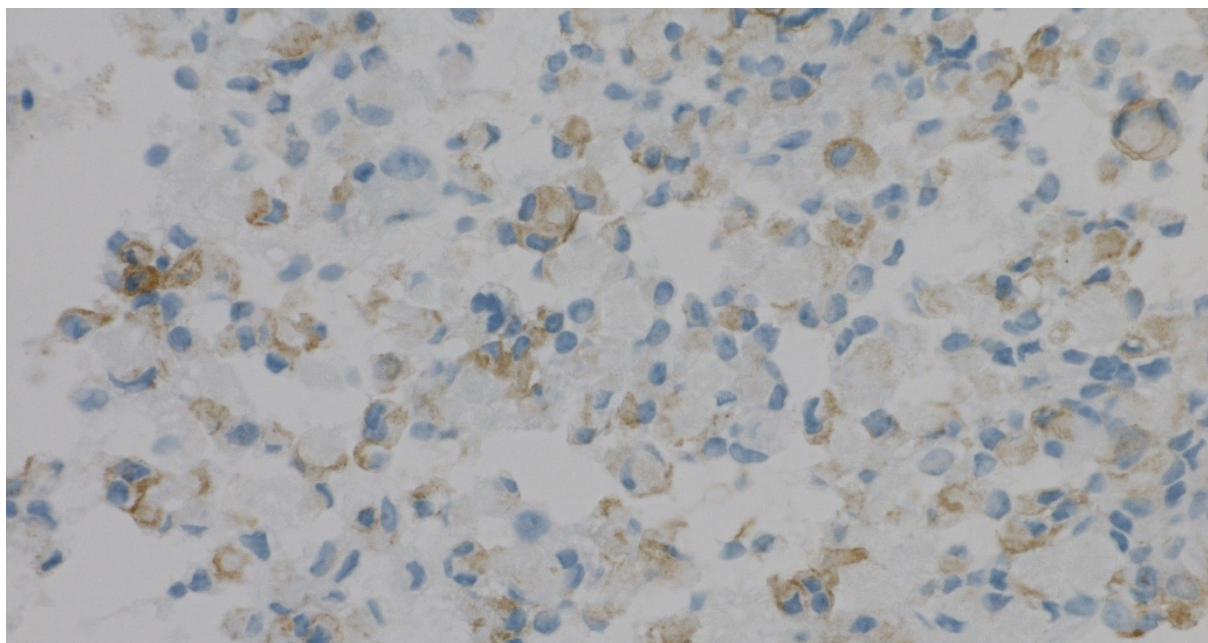


Graf č. 7.10 - ROC křivka pro SSTR5

#### 7.3.4.4 Význam koexprese $\beta$ TSH v podskupině SGST

Literární zdroje využitě ke konstrukci klasifikačního schématu pro tuto práci se ve většině případů soustředili na odlišení podskupiny SGST od zbývajících tumorů na podkladě exprese cytokeratinových intermediárních filament a na klinickopatologické korelace takto vymezené podskupiny. Koexprese  $\beta$ TSH byla v těchto tumorech ojediněle zaznamenána, avšak její význam nebyl nikdy blíže hodnocen. Z těchto důvodů jsme se rozhodli analyzovat potenciální biologický význam tohoto nálezu v naší podskupině SGST ( $n=42$ , tj. po vyloučení tří plurihormonálních  $Pit1^+$  tumorů). Průměrné množství  $\beta$ TSH imunoreaktivních buněk v této podskupině bylo 1,17 % ( $SD \pm 4,2$ ) a exprese  $\geq 1$  % buněk byla zaznamenána v 8 tumorech (19 %). Při porovnání patologických vlastností SGST s expresí  $\beta$ TSH ( $\geq 1$  % buněk,  $n=8$ ) a bez exprese  $\beta$ TSH ( $n=34$ ) jsme zaznamenali statistický rozdíl v sérové hladině TSH ( $p=0,009$ , Mann-Whitneyův test, medián 1,6 mIU u  $\beta$ TSH $^+$  oproti 0,93 mIU u  $\beta$ TSH $^-$ ), množství prolaktin-imunoreaktivních buněk ( $p=0,02$ , Mann-Whitneyův test, medián v  $\beta$ TSH $^+$  skupině 22,5 % oproti 3% v  $\beta$ TSH $^-$  skupině) a rozdíl v expresi D2DR ( $p=0,002$ , Mann-Whitneyův

test), jež byla opět vyšší ve skupině  $\beta\text{TSH}^+$  (medián H-skóre 70,8 oproti 11,6). Ilustrativní příklad exprese  $\beta\text{TSH}$  v tumoru z SGST skupiny je na obrázku 7.9.



Obrázek 7.9 – Exprese  $\beta\text{TSH}$  v nádoru, jenž splňoval definici pro SGST (400x zvětšení)

#### *7.3.4.5 Vztah exprese D2DR a prolaktinu v jednotlivých histologických podtypech*

Neboť je exprese D2DR asociovaná s prolaktinomy (viz sekce 4.7.6), rozhodli jsme se dále dodatečně prozkoumat vztah mezi imunoreaktivitou prolaktinu v nádorových buňkách a expresí D2DR. Přestože se v porovnání jednotlivých nádorových podskupin (viz sekce 7.3.4.2) exprese D2DR signifikantně nelišila, tento nálezn nemusí odrážet asociaci mezi expresí prolaktinu a D2DR, neboť kromě SLT a DGST podskupin nezahrnovala definice jednotlivých histologických subtypů přesnou kvantifikaci exprese prolaktinu (a v případě SLT se jednalo pouze o cut-off hodnotu). Z těchto důvodů jsme se rozhodli stanovit Spearmanovu korelaci mezi expresí prolaktinu a D2DR v celém souboru a dále v jednotlivých podskupinách tumorů s výjimkou DGST (jež z definice prolaktin neexprimovaly). Ani v jedné skupině však exprese prolaktinu a D2DR nevykazovala statisticky signifikantní asociaci  $p=0,09$  až  $p=0,838$ .

#### *7.3.4.6 Klinické charakteristiky jednotlivých histologických subtypů nádorů*

V této sekci jsme analyzovali vliv jednotlivých histologických subtypů na klinické parametry pacientů. Obdobně jako v sekci 7.3.4.2 jsme nejprve analyzovali rozdíly mezi skupinou SGST a non-SGST, následně rozdíly mezi jednotlivými podtypy non-SGST a v závěru rozdíly mezi všemi histologickými subtypy. Klinická data o věku a pohlaví pacientů byla dostupná u všech

případů. Údaje o vstupní sérové hladině IGF1 byly dostupné celkem u 105 pacientů (43 SGST, 26 DGST, 26 SLT a 10 purihormonálních tumorů). Údaje o vstupní sérové hladině STH byly dostupné celkem u 104 pacientů (42 SGST, 27 DGST, 25 SLT a 10 purihormonálních tumorů). Údaje o vstupní sérové hladině prolaktinu byly dostupné celkem u 103 pacientů (41 SGST, 26 DGST, 26 SLT a 10 purihormonálních tumorů). Údaje o vstupní sérové hladině TSH byly dostupné celkem u 101 pacientů (39 SGST, 26 DGST, 26 SLT a 10 purihormonálních tumorů). Údaje o největším rozměru tumoru byly dostupné celkem u 104 pacientů (42 SGST, 27 DGST, 25 SLT a 10 purihormonálních tumorů) a údaje o objemu tumorů byly dostupné celkem u 92 pacientů (36 SGST, 23 DGST, 23 SLT a 10 purihormonálních tumorů). V tabulce 7.21 je uvedeno srovnání SGST a non-SGST. V tabulce 7.22 je uvedeno srovnání jednotlivých podskupin non-SGST; mezi těmito kategoriemi jsme neprokázali žádné statisticky významné odlišnosti. V tabulce 7.23 pak uvádíme porovnání klinických parametrů všech histologických subtypů nádorů v naší studii.

Tabulka 7.21 – Srovnání klinických parametrů mezi skupinou SGST a non-SGST

	SGST (±SD)	Non-SGST (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	44,73±13,57	50,59±13,21	<b>P=0,026 (Studentův t-test)</b>
Hladina STH (µg/l, medián)	28,11±52,77	34,74±68,92	P=0,32 (MW)
Hladina prolaktinu (µg/l)	18,93±605,49	15,39±330,62	P=0,84 (MW)
Hladina TSH (mIU/l, medián)	0,96±1,04	0,93±0,76	P=0,88 (MW)
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, medián)	280±119,80	295±137,60	P=0,89 (MW)
Největší rozměr tumoru (mm, medián)	20,50±9,69	18±8,80	P=0,07 (MW)
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	2647,32±7258,03	1804,92±7177,68	P=0,07 (MW)
Pohlaví			
Muži	19	37	
Ženy	26	28	P=0,19 (χ <sup>2</sup> )
Kategorie velikosti			
Mikrotumory	4	9	
Makrotumory	35	52	
Obří tumory	3	1	P=0,29 (χ <sup>2</sup> )
Velikost makrotumorů			
10–24 mm	24	39	
24–40 mm	11	13	P=0,68 (χ <sup>2</sup> )

Tabulka 7.22 – Srovnání klinických parametrů mezi jednotlivými podtypy non-SGST

	DGST (±SD)	SLT (±SD)	Plurihormonální tumory (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	51,10±14,52	48,65±12,73	54,10±10,47	P=0,53 (ANOVA)
Hladina STH (µg/l, medián)	30,43±74,22	43,38±56,79	18±87,24	P=0,42 (KW)
Hladina prolaktinu (µg/l)	13,08±85,89	17,25±200,44	13,24±777,18	P=0,39 (KW)
Hladina TSH (mIU/l, medián)	1±0,64	0,76±0,73	1,08±1,09	P=0,62 (KW)
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, medián)	289,60±122,10	320±109,20	225±231,10	P=0,71 (KW)
Největší rozměr tumoru (mm, medián)	17±10,59	18±6,36	19,50±9,06	P=0,94 (KW)
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	2068,56±10457,91	1497,60±1909,53	2357,68±3553,59	P=0,54 (KW)
Pohlaví				
Muži	17	15	5	
Ženy	12	11	5	P=0,89(χ <sup>2</sup> )
Kategorie velikosti				
Mikrotumory	3	3	3	
Makrotumory	23	22	7	
Obří tumory	1	0	0	P=0,47(χ <sup>2</sup> )
Velikost makrotumorů				
10–24 mm	17	17	5	
24–40 mm	6	5	2	P=0,94(χ <sup>2</sup> )

Tabulka 7.23 – Srovnání klinických parametrů mezi jednotlivými podtypy non-SGST

	SGST (±SD)	DGST (±SD)	SLT (±SD)	Plurihormonální tumory (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	44,73±13,57	51,10±14,52	48,65±12,73	54,10±10,47	P=0,10 (ANOVA)
Hladina STH (µg/l, medián)	28,11±52,77	30,43±74,22	43,38±56,79	18±87,24	P=0,39 (KW)
Hladina prolaktinu (µg/l)	18,93±605,49	13,08±85,89	17,25±200,44	13,24±777,18	P=0,61 (KW)
Hladina TSH (mIU/l, medián)	0,96±1,04	1±0,64	0,76±0,73	1,08±1,09	P=0,74 (KW)
Hladina IGF1 (% nad normou pro daný věk, medián)	280±119,80	289,60±122,10	320±109,20	225±231,10	P=0,86 (KW)
Největší rozměr tumoru (mm, medián)	20,50±9,69	17±10,59	18±6,36	19,50±9,06	P=0,31 (KW)
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	2647,32±7258,03	2068,56±10457,91	1497,60±1909,53	2357,68±3553,59	P=0,21 (KW)
Pohlaví					
Muži	19	17	15	5	
Ženy	26	12	11	5	P=0,47 ( $\chi^2$ )
Kategorie velikosti					
Mikrotumory	4	3	3	3	
Makrotumory	35	23	22	7	
Obří tumory	3	1	0	0	P=0,47 ( $\chi^2$ )
Velikost makrotumorů					
10–24 mm	24	17	17	5	
24–40 mm	11	6	5	2	P=0,908 ( $\chi^2$ )

### 7.3.4.7 Korelační analýza jednotlivých histologických subtypů

Vzhledem k literárním údajům o odlišných klinickopatologických vlastnostech jednotlivých histologických subtypů nádorů a též k prokazatelně odlišným patologickým charakteristikám některých nádorových podskupin v naší studii (viz sekce 7.3.4.2) jsme se rozhodli dále zjistit, liší-li se vztah mezi klinickými a patologickými charakteristikami napříč histologickými subtypy tumorů. V takovém případě by bylo možné předpokládat odlišné korelační koeficienty veličin oproti celému souboru a jednotlivé patologické charakteristiky by mohly vykazovat v daných podskupinách odlišný prognostický význam. Za tímto účelem jsme zopakovali korelační analýzu v sekci 7.3.2 separátně pro všechny histologické podskupiny (Spearmanova korelace, viz sekce 7.3.2). V případě exprese AIP jsme vzhledem k omezenému množství vyšetřených tumorů analýzu neprováděli. Korelační matrice je uvedena v tabulce 7.24. Výsledky označené tučným fontem jsou statisticky signifikantní ( $p \leq 0,05$ ).

Tabulka 7.24 – Výsledky korelační analýzy pro jednotlivé histologické subtypy

	IGF1 (sérum)	Průměr	Objem	STH (sérum)	Prolaktin (sérum)	TSH (sérum)
Věk – celý soubor	<b><math>r=0,20</math> <math>p=0,04</math></b>	<b><math>r=-0,21</math> <math>p=0,032</math></b>	$r=-0,19$ $p=0,06$	<b><math>r=-0,26</math> <math>p=0,007</math></b>	$r=0,014$ $p=0,89$	$r=0,018$ $p=0,86$
SGST	$r=0,19$ $p=0,212$	$r=-0,11$ $p=0,481$	$r=-0,15$ $p=0,381$	$r=-0,25$ $p=0,104$	$r=-0,02$ $p=0,86$	$r=0,19$ $p=0,24$
non-SGST	$r=0,2$ $p=0,113$	$r=-0,23$ $p=0,067$	$r=-0,21$ $p=0,123$	<b><math>r=-0,3</math> <math>p=0,016</math></b>	$r=0,127$ $p=0,327$	$r=-0,128$ $p=0,321$
DGST	$r=0,353$ $p=0,077$	$r=-0,36$ $p=0,062$	$r=-0,32$ $p=0,132$	<b><math>r=-0,391</math> <math>p=0,044</math></b>	$r=0,05$ $p=0,782$	$r=-0,27$ $p=0,187$
SLT	$r=0,22$ $p=0,281$	$r=-0,16$ $p=0,43$	$r=-0,24$ $p=0,27$	$r=-0,16$ $p=0,46$	$r=-0,08$ $p=0,69$	$r=-0,16$ $p=0,44$
Plurihormonání tu.	$r=-0,05$ $p=0,885$	$r=0,05$ $p=0,887$	$r=0,001$ $p=0,996$	$r=-0,429$ $p=0,22$	$r=0,434$ $p=0,21$	$r=0,036$ $p=0,921$
Imunoreaktivita prolaktinu (%) – celý soubor	<b><math>\rho=-0,053</math> <math>p=0,58</math></b>	<b><math>\rho=-0,07</math> <math>p=0,46</math></b>	<b><math>\rho=-0,15</math> <math>p=0,17</math></b>	<b><math>\rho=-0,10</math> <math>p=0,28</math></b>	<b><math>\rho=0,3</math> <math>p=0,002</math></b>	<b><math>\rho=-0,06</math> <math>p=0,7</math></b>
SGST	$\rho=-0,1$ $p=0,52$	$\rho=-0,02$ $p=0,881$	$\rho=0,03$ $p=0,851$	$\rho=-0,09$ $p=0,552$	<b><math>\rho=0,497</math> <math>p=0,001</math></b>	$\rho=0,073$ $p=0,112$
non-SGST	$\rho=-0,05$ $p=0,727$	$\rho=-0,03$ $p=0,831$	$\rho=-0,16$ $p=0,233$	$\rho=-0,1$ $p=0,424$	$\rho=0,18$ $p=0,162$	$\rho=-0,09$ $p=0,459$
DGST	$\rho=-0,22$ $p=0,283$	$\rho=-0,31$ $p=0,112$	$\rho=-0,39$ $p=0,067$	$\rho=-0,05$ $p=0,818$	$\rho=-0,18$ $p=0,376$	$\rho=-0,19$ $p=0,342$
SLT	$\rho=0,18$ $p=0,382$	$\rho=0,39$ $p=0,053$	$\rho=0,33$ $p=0,123$	$\rho=0,06$ $p=0,77$	$\rho=0,35$ $p=0,08$	$\rho=0,21$ $p=0,309$
Plurihormonání tu.	$\rho=-0,44$ $p=0,185$	$\rho=-0,15$ $p=0,656$	$\rho=-0,19$ $p=0,559$	<b><math>\rho=-0,89</math> <math>P&lt;0,0001</math></b>	$\rho=0,08$ $p=0,81$	$\rho=-0,16$ $p=0,631$
Imunoreaktivita $\beta$ TSH	<b><math>\rho=-0,08</math></b>	<b><math>\rho=-0,09</math></b>	<b><math>\rho=-0,14</math></b>	<b><math>\rho=-0,08</math></b>	<b><math>\rho=-0,02</math></b>	<b><math>\rho=0,11</math></b>

(%) – celý soubor	p=0,41	p=0,34	p=0,7	p=0,4	p=0,87	p=0,27
SGST	$\rho=-0,08$ p=0,591	$\rho=-0,21$ p=0,176	$\rho=-0,18$ p=0,294	$\rho=-0,11$ p=0,503	$\rho=0,11$ p=0,504	$\rho=0,26$ p=0,112
non-SGST	$\rho=-0,09$ p=0,462	$\rho=-0,03$ p=0,81	$\rho=0,02$ p=0,857	$\rho=-0,07$ p=0,588	$\rho=-0,09$ p=0,479	$\rho=0,05$ p=0,696
DGST	$\rho=0,16$ p=0,43	$\rho=0,21$ p=0,286	$\rho=0,15$ p=0,472	$\rho=0,21$ p=0,286	$\rho=0,1$ p=0,608	$\rho=0,17$ p=0,407
SLT	$\rho=-0,16$ p=0,43	$\rho=-0,22$ p=0,38	$\rho=-0,14$ p=0,53	$\rho=0,09$ p=0,618	$\rho=-0,27$ p=0,188	$\rho=-0,25$ p=0,218
Plurihormonální tu.	$\rho=-0,5$ p=0,126	$\rho=-0,29$ p=0,384	$\rho=-0,29$ p=0,384	$\rho=-0,17$ p=0,631	$\rho=-0,21$ p=0,535	$\rho=-0,15$ p=0,656
Množství fibrózních tělísk (%) – celý soubor	$\rho=0,01$ p=0,9	$\rho=0,05$ p=0,6	$\rho=0,03$ p=0,8	$\rho=-0,12$ p=0,26	$\rho=0,002$ p=0,98	$\rho=0,006$ p=0,95
SGST	$\rho=-0,04$ p=0,823	$\rho=0,01$ p=0,969	$\rho=0,153$ p=0,384	$\rho=0,01$ p=0,926	$\rho=-0,27$ p=0,098	$\rho=0,21$ p=0,203
non-SGST	$\rho=0,05$ p=0,682	$\rho=-0,33$ <b>p=0,009</b>	$\rho=-0,47$ <b>p=&lt;0,001</b>	$\rho=-0,22$ p=0,09	$\rho=-0,01$ p=0,94	$\rho=-0,18$ p=0,173
DGST	$\rho=-0,11$ p=0,6	$\rho=-0,29$ p=0,163	$\rho=-0,32$ p=0,157	$\rho=-0,35$ p=0,087	$\rho=-0,08$ p=0,697	$\rho=0,11$ p=0,618
SLT	$\rho=0,03$ p=0,873	$\rho=-0,28$ p=0,187	$\rho=-0,47$ <b>p=0,027</b>	$\rho=-0,35$ p=0,094	$\rho=-0,04$ p=0,864	$\rho=-0,5$ <b>p=0,01</b>
Plurihormonální tu.	$\rho=0,337$ p=0,327	$\rho=-0,71$ <b>p=0,019</b>	$\rho=-0,76$ <b>p=0,008</b>	$\rho=-0,01$ p=0,973	$\rho=-0,463$ p=0,16	$\rho=-0,04$ p=0,892
Ki67 (%) (n=101) – celý soubor	$\rho=0,09$ p=0,34	$\rho=0,11$ p=0,27	$\rho=0,10$ p=0,36	$\rho=0,351$ <b>p=0,0005</b>	$\rho=0,15$ p=0,15	$\rho=0,11$ p=0,29
SGST	$\rho=0,25$ p=0,123	$\rho=0,17$ p=0,309	$\rho=0,23$ p=0,194	$\rho=0,35$ <b>p=0,031</b>	$\rho=0,15$ p=0,373	$\rho=-0,04$ p=0,819
non-SGST	$\rho=-0,01$ p=0,948	$\rho=0,05$ p=0,736	$\rho=0,01$ p=0,964	$\rho=0,34$ <b>p=0,008</b>	$\rho=0,15$ p=0,27	$\rho=0,19$ p=0,15
DGST	$\rho=-0,07$ p=0,749	$\rho=0,03$ p=0,893	$\rho=-0,03$ p=0,899	$\rho=0,41$ <b>p=0,039</b>	$\rho=0,18$ p=0,4	$\rho=0,25$ p=0,24
SLT	$\rho=0,29$ p=0,157	$\rho=0,004$ p=0,98	$\rho=-0,02$ p=0,94	$\rho=0,28$ p=0,188	$\rho=-0,04$ p=0,84	$\rho=0,13$ p=0,555
Plurihormonální tu.	$\rho=0$ p=1	$\rho=-0,01$ p=0,973	$\rho=0,1$ p=0,759	$\rho=0,39$ p=0,24	$\rho=0,31$ p=0,365	$\rho=0,26$ p=0,446
Mitózy/10 HPF – celý soubor	$\rho=0,033$ p=0,75	$\rho=-0,03$ p=0,76	$\rho=0,04$ p=0,74	$\rho=0,053$ p=0,6	$\rho=-0,04$ p=0,67	$\rho=0,06$ p=0,54
SGST	$\rho=-0,13$ p=0,42	$\rho=0,05$ p=0,762	$\rho=0,13$ p=0,489	$\rho=0,09$ p=0,571	$\rho=-0,02$ p=0,911	$\rho=0,08$ p=0,642
non-SGST	$\rho=0,15$ p=0,272	$\rho=-0,16$ p=0,241	$\rho=-0,12$ p=0,378	$\rho=0,03$ p=0,81	$\rho=-0,11$ p=0,408	$\rho=0,06$ p=0,66
DGST	$\rho=0,45$ <b>p=0,027</b>	$\rho=-0,17$ p=0,412	$\rho=-0,09$ p=0,686	$\rho=0,09$ p=0,668	$\rho=0,09$ p=0,65	$\rho=0,19$ p=0,364
SLT	$\rho=0,08$ p=0,706	$\rho=-0,08$ p=0,706	$\rho=0,01$ p=0,96	$\rho=0,04$ p=0,83	$\rho=-0,35$ p=0,09	$\rho=-0,04$ p=0,84
Plurihormonální tu.	$\rho=-0,46$ p=0,16	$\rho=-0,37$ p=0,275	$\rho=-0,29$ p=0,384	$\rho=-0,22$ p=0,54	$\rho=-0,001$ p=0,87	$\rho=0,05$ p=0,87
H-skóre pro E- cadherin – celý soubor	$\rho=-0,02$ p=0,81	$\rho=-0,23$ <b>p=0,017</b>	$\rho=-0,28$ <b>p=0,006</b>	$\rho=0,04$ p=0,67	$\rho=0,01$ p=0,86	$\rho=-0,06$ p=0,55



SGST	$\rho=-0,14$ $p=0,362$	$\rho=-0,01$ $p=0,976$	$\rho=-0,17$ $p=0,321$	$\rho=0,1$ $p=0,543$	$\rho=0,25$ $p=0,12$	$\rho=-0,02$ $p=0,9$
non-SGST	$\rho=0$ $p=1$	$\rho=-0,04$ $p=0,764$	$\rho=-0,06$ $p=0,682$	$\rho=-0,04$ $p=0,77$	$\rho=0,01$ $p=0,97$	$\rho=0,18$ $p=0,17$
DGST	$\rho=0,21$ $p=0,29$	$\rho=0,3$ $p=0,868$	$\rho=0,01$ $p=0,959$	$\rho=0,02$ $p=0,921$	$\rho=0,19$ $p=0,358$	$\rho=0,15$ $p=0,46$
SLT	$\rho=-0,32$ $p=0,1$	$\rho=-0,18$ $p=0,4$	$\rho=-0,22$ $p=0,321$	$\rho=-0,26$ $p=0,2$	$\rho=-0,09$ $p=0,632$	$\rho=0,28$ $p=0,16$
Plurihormonání tu.	$\rho=0,19$ $p=0,559$	$\rho=0,04$ $p=0,892$	$\rho=0,09$ $p=0,759$	$\rho=0,42$ $p=0,21$	$\rho=-0,2$ $p=0,56$	$\rho=-0,02$ $p=0,919$
H-skóre pro SSTR1 – celý soubor	$\rho=0,05$ $p=0,64$	$\rho=-0,06$ $p=0,55$	$\rho=-0,11$ $p=0,28$	$\rho=0,07$ $p=0,49$	$\rho=-0,01$ $p=0,94$	$\rho=-0,06$ $p=0,55$
SGST	$\rho=0,25$ $p=0,101$	$\rho=-0,06$ $p=0,696$	$\rho=-0,17$ $p=0,333$	$\rho=-0,06$ $p=0,719$	$\rho=-0,23$ $p=0,141$	$\rho=0,08$ $p=0,63$
non-SGST	$\rho=-0,12$ $p=0,366$	$\rho=0,04$ $p=0,766$	$\rho=0,004$ $p=0,98$	$\rho=0,12$ $p=0,351$	$\rho=0,17$ $p=0,19$	$\rho=-0,15$ $p=0,25$
DGST	$\rho=-0,28$ $p=0,16$	$\rho=0,17$ $p=0,389$	$\rho=0,16$ $p=0,45$	$\rho=0,07$ $p=0,711$	$\rho=0,24$ $p=0,24$	$\rho=0,12$ $p=0,529$
SLT	$\rho=-0,02$ $p=0,94$	$\rho=0,0001$ $p=0,99$	$\rho=-0,001$ $p=0,966$	$\rho=0,19$ $p=0,353$	$\rho=0,02$ $p=0,915$	$\rho=-0,05$ $p=0,79$
Plurihormonání tu.	$\rho=-0,14$ $p=0,68$	$\rho=-0,28$ $p=0,4$	$\rho=-0,29$ $p=0,384$	$\rho=0,04$ $p=0,865$	$\rho=0,26$ $p=0,446$	$\rho=-0,86$ $p=0,0001$
H-skóre pro SSTR2A – celý soubor	$\rho=0,1$ $p=0,3$	$\rho=-0,21$ $p=0,03$	$\rho=-0,23$ $p=0,03$	$\rho=0,06$ $p=0,53$	$\rho=-0,11$ $p=0,27$	$\rho=-0,1$ $p=0,33$
SGST	$\rho=0,13$ $p=0,395$	$\rho=-0,08$ $p=0,6$	$\rho=-0,11$ $p=0,53$	$\rho=-0,02$ $p=0,9$	$\rho=-0,08$ $p=0,625$	$\rho=-0,47$ $p=0,002$
non-SGST	$\rho=0,11$ $p=0,414$	$\rho=-0,17$ $p=0,185$	$\rho=-0,18$ $p=0,19$	$\rho=0,003$ $p=0,983$	$\rho=-0,14$ $p=0,27$	$\rho=0,09$ $p=0,452$
DGST	$\rho=0,08$ $p=0,66$	$\rho=-0,11$ $p=0,58$	$\rho=-0,21$ $p=0,328$	$\rho=0,06$ $p=0,759$	$\rho=0,01$ $p=0,952$	$\rho=0,09$ $p=0,647$
SLT	$\rho=-0,31$ $p=0,12$	$\rho=-0,23$ $p=0,26$	$\rho=-0,17$ $p=0,442$	$\rho=-0,27$ $p=0,18$	$\rho=-0,19$ $p=0,358$	$\rho=0,06$ $p=0,784$
Plurihormonání tu.	$\rho=0,62$ $p=0,053$	$\rho=-0,43$ $p=0,199$	$\rho=-0,42$ $p=0,213$	$\rho=0,44$ $p=0,185$	$\rho=-0,54$ $p=0,097$	$\rho=0,09$ $p=0,785$
H-skóre pro SSTR3 – celý soubor	$\rho=0,06$ $p=0,53$	$\rho=-0,03$ $p=0,79$	$\rho=0,01$ $p=0,95$	$\rho=0,21$ $p=0,03$	$\rho=-0,02$ $p=0,85$	$\rho=-0,06$ $p=0,58$
SGST	$\rho=0,01$ $p=0,968$	$\rho=0,15$ $p=0,34$	$\rho=0,09$ $p=0,582$	$\rho=0,2$ $p=0,2$	$\rho=0,06$ $p=0,72$	$\rho=0,064$ $p=0,696$
non-SGST	$\rho=0,04$ $p=0,749$	$\rho=0,004$ $p=0,975$	$\rho=0,06$ $p=0,652$	$\rho=0,19$ $p=0,146$	$\rho=-0,09$ $p=0,505$	$\rho=-0,07$ $p=0,569$
DGST	$\rho=0,1$ $p=0,6$	$\rho=0,24$ $p=0,235$	$\rho=0,22$ $p=0,306$	$\rho=0,34$ $p=0,078$	$\rho=-0,09$ $p=0,661$	$\rho=-0,05$ $p=0,823$
SLT	$\rho=-0,25$ $p=0,223$	$\rho=-0,36$ $p=0,077$	$\rho=-0,33$ $p=0,121$	$\rho=-0,39$ $p=0,051$	$\rho=0,02$ $p=0,939$	$\rho=-0,275$ $p=0,171$
Plurihormonání tu.	$\rho=0,38$ $p=0,258$	$\rho=-0,15$ $p=0,656$	$\rho=-0,09$ $p=0,785$	$\rho=0,79$ $p=0,004$	$\rho=-0,23$ $p=0,49$	$\rho=0,13$ $p=0,7$
H-skóre pro SSTR5 – celý soubor	$\rho=-0,05$ $p=0,64$	$\rho=0,13$ $p=0,18$	$\rho=0,09$ $p=0,36$	$\rho=-0,04$ $p=0,7$	$\rho=0,02$ $p=0,85$	$\rho=-0,002$ $p=0,99$
SGST	$\rho=-0,03$ $p=0,85$	$\rho=0,09$ $p=0,574$	$\rho=-0,02$ $p=0,93$	$\rho=-0,01$ $p=0,964$	$\rho=-0,137$ $p=0,392$	$\rho=0$ $p=1$

non-SGST	$\rho=-0,02$ $p=0,864$	$\rho=0,05$ $p=0,696$	$\rho=0,08$ $p=0,573$	$\rho=-0,03$ $p=0,789$	$\rho=0,135$ $p=0,293$	$\rho=-0,05$ $p=0,69$
DGST	$\rho=-0,09$ $p=0,644$	$\rho=0,08$ $p=0,677$	$\rho=0,08$ $p=0,72$	$\rho=0,15$ $p=0,445$	$\rho=0,24$ $p=0,241$	$\rho=0,13$ $p=0,513$
SLT	$\rho=0,07$ $p=0,725$	$\rho=-0,17$ $p=0,423$	$\rho=-0,15$ $p=0,489$	$\rho=-0,17$ $p=0,404$	$\rho=0,09$ $p=0,654$	$\rho=-0,34$ $p=0,086$
Plurihormonání tu.	$\rho=0,003$ $p=0,973$	$\rho=0,35$ $p=0,3$	$\rho=0,39$ $p=0,243$	$\rho=-0,08$ $p=0,81$	$\rho=0,13$ $p=0,7$	$\rho=0,08$ $p=0,81$
H-skóre pro D2DR – celý soubor	$\rho=-0,28$ $p=0,003$	$\rho=-0,05$ $p=0,6$	$\rho=-0,05$ $p=0,63$	$\rho=0,03$ $p=0,78$	$\rho=0,02$ $p=0,83$	$\rho=0,27$ $p=0,007$
SGST	$\rho=-0,32$ $p=0,038$	$\rho=0,09$ $p=0,551$	$\rho=0,1$ $p=0,543$	$\rho=-0,09$ $p=0,528$	$\rho=0,05$ $p=0,776$	$\rho=0,35$ $p=0,031$
non-SGST	$\rho=-0,3$ $p=0,018$	$\rho=-0,07$ $p=0,566$	$\rho=-0,07$ $p=0,595$	$\rho=0,06$ $p=0,636$	$\rho=-0,03$ $p=0,843$	$\rho=0,21$ $p=0,093$
DGST	$\rho=-0,13$ $p=0,511$	$\rho=0,13$ $p=0,522$	$\rho=0,14$ $p=0,515$	$\rho=0,19$ $p=0,325$	$\rho=0,13$ $p=0,535$	$\rho=0,17$ $p=0,4$
SLT	$\rho=-0,43$ $p=0,03$	$\rho=-0,48$ $p=0,013$	$\rho=-0,57$ $p=0,004$	$\rho=-0,18$ $p=0,39$	$\rho=-0,07$ $p=0,718$	$\rho=0,22$ $p=0,27$
Plurihormonání tu.	$\rho=-0,48$ $p=0,148$	$\rho=-0,08$ $p=0,811$	$\rho=-0,04$ $p=0,892$	$\rho=-0,1$ $p=0,759$	$\rho=-0,2$ $p=0,54$	$\rho=0,48$ $p=0,148$

Mitotická aktivita korelovala pozitivně s hladinou IGF1 pouze u DGST a nikoliv u dalších podskupin. Přestože jsou obecně mitózy v PitNETech neobvyklé, minimálně jedna mitóza byla zaznamenána u 7 z 27 DGST a nejspíše se tedy jedná o skutečný trend (nikoliv následek přítomnosti odlehklých hodnot), avšak nelineárního charakteru ( $r=0,367$ ,  $p=0,0775$ ).

### 7.3.5 Analýza patologických faktorů podmiňujících velikost tumorů

Neboť je velikost tumoru jedním z nejvýznamnějších prognostických faktorů, jenž v konečném důsledku souvisí s invazí okolních struktur, resekalibilitou a případnou rekurencí po inkompletní resekci, rozhodli jsme se zjistit, jak se po patologické stránce odlišují malé a velké somatotropní PitNETy. Neboť konvenční rozdělení tumorů na mikrotumory, makrotumory a obří tumory vedlo vzhledem k charakteristikám našeho souboru k výrazně nerovnoměrnému rozdělení v jednotlivých kategoriích, rozhodli jsme se rozdělit celý soubor a dále všechny histologické podskupiny tumorů pomocí hodnoty mediánu největšího rozměru na dvě stejné poloviny velkých a malých tumorů a jejich patologické parametry vzájemně porovnat, k zajištění lepší statistické hodnotitelnosti dat. Do skupiny malých tumorů byly zahrnuty též tumory s velikostí odpovídající mediánu. Z analýzy byly vyřazeny tumory, u nichž chyběl údaj o největším rozměru. Přehled mediánů v jednotlivých skupinách tumorů a velikosti takto definovaných podskupin jsou uvedeny v tabulce 7.25.

Tabulka 7.25 – Velikost mediánů velikostí v jednotlivých podskupinách tumorů

	Celý soubor	SGST	Non-SGST	DGST	SLT	Plurihormonální tumory
Medián největšího rozměru	19 mm	20,5 mm	18 mm	17 mm	18 mm	19,5 mm
Počet případů	104	42	62	27	25	10
Malé tumory	53	21	33	14	13	5
Velké tumory	51	21	29	13	12	5

Vzhledem k statisticky signifikantní asociaci velikosti tumoru a invazivity (viz tabulka 7.12) jsme se rozhodli nezahrnout údaje o invazi do následující analýzy. Ze stejného důvodu jsme neposuzovali ani kompletní grade dle Trouillas. Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v tabulkách 7.26 – 7.31. U plurihormonálních tumorů (n=10) je statistická výpovědní hodnota vzhledem k počtu případů omezená.

Tabulka 7.26 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory v celé souboru

	Malé tumory ( $\pm$ SD)	Velké tumory ( $\pm$ SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% medián)	5 $\pm$ 24,70	5 $\pm$ 28,40	p=0,26 (MW)
Množství $\beta$ TSH imunoreaktivních buněk (% medián)	0 $\pm$ 3,68	0 $\pm$ 11	p=0,34 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% medián)	2,88 $\pm$ 2,05	3 $\pm$ 1,76	p=0,39 (MW)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% medián)	30 $\pm$ 40,10	45 $\pm$ 43,90	p=0,62 (MW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0 $\pm$ 0,75	0 $\pm$ 1,04	p=0,56 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	148 $\pm$ 99,04	62 $\pm$ 90,95	p=0,029 (MW)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	1,33 $\pm$ 16,36	0,67 $\pm$ 33,40	p=0,64 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	205 $\pm$ 89,12	165 $\pm$ 80,88	p=0,06 (MW)
H-skóre pro SSTR3 (medián)	70,05 $\pm$ 65,46	48,10 $\pm$ 70,82	p=0,36 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	66,67 $\pm$ 63,33	70 $\pm$ 76,56	p=0,98 (MW)
H-skóre pro D2DR (medián)	28,33 $\pm$ 35,20	16 $\pm$ 40,78	p=0,87 (MW)
H-skóre pro AIP (průměr)	234,72 $\pm$ 28,27	237,14 $\pm$ 41,81	p=0,88 (Studentův t- test)
Proliferační aktivita			
Trouillas „B“	13	16	
Trouillas „A“	35	29	P = 0,51 ( $\chi^2$ )
Expres p53			
Pozitivní	21	23	
Negativní	29	28	P = 0,91 ( $\chi^2$ )

Tabulka 7.27 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u SGST

	Malé tumory ( $\pm$ SD)	Velké tumory ( $\pm$ SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (%, medián)	5 $\pm$ 26,90	3 $\pm$ 14,50	p=0,68 (MW)
Množství $\beta$ TSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0 $\pm$ 2,52	0 $\pm$ 5,45	p=0,08 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , průměr)	3,19 $\pm$ 2,32	3,51 $\pm$ 1,64	p=0,64 (Studentův t- test)
Množství buněk s fibrózními tělisky (% , medián)	100 $\pm$ 28,80	100 $\pm$ 9,60	p=0,55 (MW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0 $\pm$ 0,89	0 $\pm$ 0,97	p=0,83 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	0 $\pm$ 40,89	0 $\pm$ 32,58	p=0,75 (MW)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	1 $\pm$ 6,35	0,17 $\pm$ 11,88	p=0,22 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	150 $\pm$ 86,79	108 $\pm$ 75,94	p=0,58 (MW)
H-skóre pro SSTR3 (medián)	34,16 $\pm$ 32,30	40,47 $\pm$ 39,85	p=0,30 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (průměr)	113,76 $\pm$ 75,80	107,03 $\pm$ 72,02	p=0,77 (Studentův t- test)
H-skóre pro D2DR (medián)	13,30 $\pm$ 30,18	15 $\pm$ 33,02	p=0,64 (MW)
Proliferační aktivita			
Trouillas „B“	6	9	
Trouillas „A“	11	10	P = 0,69 ( $\chi^2$ )
Expres p53			
Pozitivní	11	12	
Negativní	8	9	P = 0,79 ( $\chi^2$ )

Tabulka 7.28 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u non-SGST

	Malé tumory ( $\pm$ SD)	Velké tumory ( $\pm$ SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% medián)	8 $\pm$ 26	10 $\pm$ 31,60	p=0,37 (MW)
Množství $\beta$ TSH imunoreaktivních buněk (% medián)	0 $\pm$ 4,20	0 $\pm$ 13,90	p=0,7 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% průměr)	2,84 $\pm$ 1,65	3,38 $\pm$ 2,10	p=0,28 (Studentův t- test)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% medián)	10 $\pm$ 21,20	0 $\pm$ 17,70	p=0,053 (MW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0 $\pm$ 0,67	0 $\pm$ 1,12	p=0,5 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (průměr)	185,49 $\pm$ 61,39	161,03 $\pm$ 66,72	p=0,14 (Studentův t- test)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	2 $\pm$ 20,02	2,33 $\pm$ 42,17	p=0,85 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	215 $\pm$ 61,68	208 $\pm$ 70,97	p=0,11 (MW)
H-skóre pro SSTR3 (medián)	97,88 $\pm$ 64,62	70,17 $\pm$ 86,44	p=0,44 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	43,67 $\pm$ 57,65	40 $\pm$ 67,68	p=0,78 (MW)
H-skóre pro D2DR (medián)	41,67 $\pm$ 37,14	24,17 $\pm$ 45,59	p=0,91 (MW)
Proliferační aktivita			
Trouillas „B“	6	8	
Trouillas „A“	26	17	P = 0,39 ( $\chi^2$ )
Expres p53			
Pozitivní	9	12	
Negativní	23	17	P = 0,41 ( $\chi^2$ )

Tabulka 7.29 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u DGST

	Malé tumory ( $\pm$ SD)	Velké tumory ( $\pm$ SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% medián)	1 $\pm$ 2,90	2 $\pm$ 21,80	p=0,80 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , průměr)	2,32 $\pm$ 1,93	3,08 $\pm$ 2,07	p=0,36 (Studentův t- test)
Množství buněk s fibrózními tělisky (% , medián)	0 $\pm$ 4,53	0 $\pm$ 7,53	p=0,22 (MW)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	1 $\pm$ 0,66	0 $\pm$ 0,39	p=0,08 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (průměr)	182,14 $\pm$ 65,46	160,15 $\pm$ 70,89	p=0,41 (Studentův t- test)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	1,17 $\pm$ 25,89	2,68 $\pm$ 59,32	p=0,28 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (medián)	248,83 $\pm$ 70,37	234,67 $\pm$ 67,48	p=0,90 (MW)
H-skóre pro SSTR3 (průměr)	102,54 $\pm$ 68,96	149,89 $\pm$ 93,53	p=0,15 (Studentův t- test)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	68,30 $\pm$ 60,96	61 $\pm$ 71,78	p=0,88 (MW)
H-skóre pro D2DR (medián)	18,30 $\pm$ 30,49	0,30 $\pm$ 53,95	p=0,86 (MW)
Proliferační aktivita			
Trouillas „B“	2	6	
Trouillas „A“	12	7	P = 0,10 (Fisherův přesný test)
Exprese p53			
Pozitivní	3	3	
Negativní	10	8	P = 1 (Fisherův přesný test)

Tabulka 7.30 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u SLT

	Malé tumory (±SD)	Velké tumory (±SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% průměr)	39,20±29,20	52,50±28	p=0,26 (Studentův t- test)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , průměr)	3,32±1,27	3,64±2,29	p=0,69 (Welchův t- test)
Množství buněk s fibrózními tělisky (% , průměr)	28,50±21,70	20,90±23,30	p=0,42 (Studentův t- test)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0±0,65	0±1,16	p=0,97 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (průměr)	190,69±63,40	167±65,95	p=0,37 (Studentův t- test)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	6,33±15,05	3,50±17	p=0,87 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (průměr)	213,82±43,97	186±64,86	p=0,23 (Studentův t- test)
H-skóre pro SSTR3 (průměr)	92,21±56,37	46,15±41,04	<b>p=0,03</b> <b>(Studentův</b> <b>t-test)</b>
H-skóre pro SSTR5 (medián)	38,33±53,37	35,67±36,49	p=0,15 (MW)
H-skóre pro D2DR (průměr)	59,05±25	30,30±34,50	<b>p=0,025</b> <b>(Studentův</b> <b>t-test)</b>
Proliferační aktivita			
Trouillas „B“	2	4	
Trouillas „A“	10	6	P = 0,35 (Fisherův přesný test)
Expres p53			
Pozitivní	3	6	
Negativní	10	6	P = 0,23 (Fisherův přesný test)



Tabulka 7.31 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u plurihormonálních tumorů

	Malé tumory ( $\pm$ SD)	Velké tumory ( $\pm$ SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% průměr)	18 $\pm$ 21,70	22 $\pm$ 20,20	p=0,77 (Studentův t- test)
Množství $\beta$ TSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	10 $\pm$ 4,18	5 $\pm$ 29,20	p=0,69 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , průměr)	3,96 $\pm$ 1,80	2,56 $\pm$ 1,29	p=0,19 (Studentův t- test)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% ,průměr)	32 $\pm$ 25,600	5 $\pm$ 7,07	p=0,05 (Studentův t- test)
Množství mitóz (/10HPF, medián)	0 $\pm$ 0,89	0 $\pm$ 0	p=0,31 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (průměr)	204 $\pm$ 55,17	130,80 $\pm$ 46,19	p=0,05 (Studentův t- test)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	2 $\pm$ 1,46	0,50 $\pm$ 9,46	p=0,59 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (průměr)	206,67 $\pm$ 74,38	147 $\pm$ 93,74	p=0,3 (Studentův t- test)
H-skóre pro SSTR3 (průměr)	121,43 $\pm$ 87,24	69,78 $\pm$ 60,46	p=0,31 (Studentův t- test)
H-skóre pro SSTR5 (průměr)	70,73 $\pm$ 80,43	94,07 $\pm$ 91,22	p=0,68 (Studentův t- test)
H-skóre pro D2DR (průměr)	65,27 $\pm$ 60,09	47,03 $\pm$ 22,08	p=0,61 (Studentův t- test)
Proliferační aktivita			
Trouillas „B“	3	0	
Trouillas „A“	2	5	P = 0, 17 (Fisherův přesný test)
Exprese p53			
Pozitivní	3	0	
Negativní	2	5	P = 0,17 (Fisherův přesný test)

## 7.4 Analýza faktorů s potenciálním prediktivním významem

### 7.4.1 Deskriptivní charakteristiky podskupiny pacientů léčených SSA, u kterých byla prováděna analýza prediktivních faktorů

Do následující analýzy bylo z celého souboru zahrnuto celkem 31 pacientů (28 %). Z těchto 31 pacientů podstoupilo 7 pacientů neoadjuvantní léčbu SSA; vzhledem k výsledkům v sekci 7.2 jsme se rozhodli tyto pacienty zahrnout do následující analýzy, s vyloučením faktorů potenciálně ovlivněných předchozí léčbou (exprese Ki67 a proliferativita). Z těchto 31 pacientů bylo dále 5 pacientů (16 %) během analyzovaného intervalu léčby SSA léčeno současně dopaminovým agonistou cabergolinem. Žádný z těchto pacientů nespadal současně do obou podskupin (tedy předléčených pacientů a pacientů s cabergolinem). Medián časového intervalu od zahájení léčby SSA do výstupní analýzy hladiny IGF1 byl 10,6 měsíce, průměrná délka tohoto intervalu byla 12,3 měsíce ( $SD \pm 6,7$ ). 9 pacientů užívalo přípravek Somatuline Autogel (lanreotid), 21 pacientů užívalo přípravek Sandostatin (oktreotid). U jedné pacientky nebylo možné v registru dohledat použitý přípravek. Deskriptivní charakteristiky souboru jsou uvedeny v tabulce 7.32 (intervalové proměnné) a 7.33 (kategorické proměnné).

Tabulka 7.32 – Deskriptivní charakteristiky podsouboru léčeného SSA

	Průměr	Medián	S.D.
Věk (roky)	43,58	42	14,63
Hladina STH ( $\mu\text{g/l}$ , $n=31$ )	71,42	51,70	66,74
Hladina prolaktinu ( $\mu\text{g/l}$ , $n=31$ )	248,88	24,13	665,76
Hladina TSH ( $\text{mIU/l}$ , $n=30$ )	1,04	0,79	1,17
Hladina IGF1 v době diagnózy (% nad normou pro daný věk, $n=31$ )	354,40	330	154,60
Největší rozměr tumoru (mm, $n=30$ )	25,08	23	9,49
Objem tumoru ( $\text{mm}^3$ , $n=28$ )	7419,35	3759,60	8287,94
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (%)	19,70	5	28,10
Množství $\beta\text{TSH}$ imunoreaktivních buněk (%)	0,20	0	0,90
Množství buněk s fibrózními tělísky (%)	58,90	75,50	42,30
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (%), $n=24$ )	3,42	3,47	2,12
Množství mitóz (/10HPF, $n=28$ )	0,54	0	0,99
H-skóre pro E-cadherin	81,50	7	92,16
H-skóre pro SSTR1	13,39	0,52	34,37
H-skóre pro SSTR2A	141,08	155,33	83,19
H-skóre pro SSTR3	66,09	48,10	51,54
H-skóre pro SSTR5	86,94	70	69,33
H-skóre pro D2DR	21,81	13,30	24,76
H-skóre pro AIP ( $n=31$ )	234,52	240	38,62

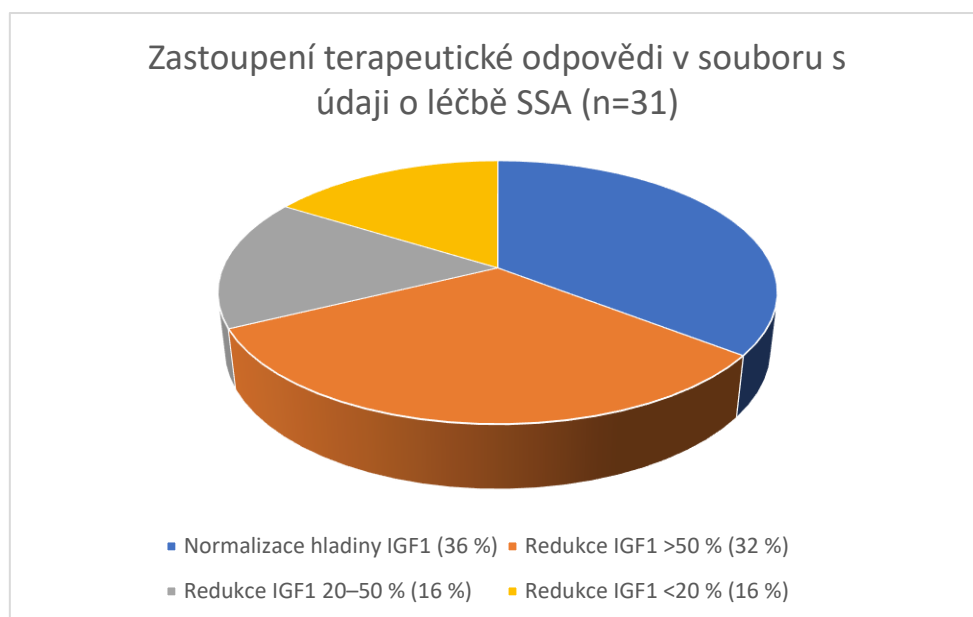
Tabulka 7.33 – Kategorické charakteristiky podsouboru léčeného SSA

Pohlaví (n=31)	Ženy – 14 (45 %)	Muži – 17 (55 %)
Pozitivita p53 (n=28)	Negativní - 15 (54 %)	Pozitivní – 13 (46 %)
Proliferativita (n=22)	Trouillas „A“ – 14 (64 %)	Trouillas „B“ – 8 (36 %)
Invazivita (n=23)	Invazivní – 15 (65,2 %)	Neinvazivní – 8 (34,8 %)
Grade dle Trouillas (n=16)	1a – 5 (31,25 %)	2a – 5 (31,25 %)
	1b – 2 (12,5 %)	2b – 4 (25 %)
Velikost tumorů (n=30)	Mikrotumory – 2 (7 %)	Makrotumory – 26 (86 %)
	Obří tumory - 2 (7 %)	
Velikost makrotumorů (n=26)	10–24 mm – 14 (54 %)	25–40 mm – 12 (46 %)
Histologický subtyp	SGST – 16 (52 %)	DGST – 4 (13 %)
	SLT – 9 (29 %)	Plurihormonální tumory – 1 (3 %)
		Pit1 <sup>+</sup> plurihorm. tumor – 1 (3 %)

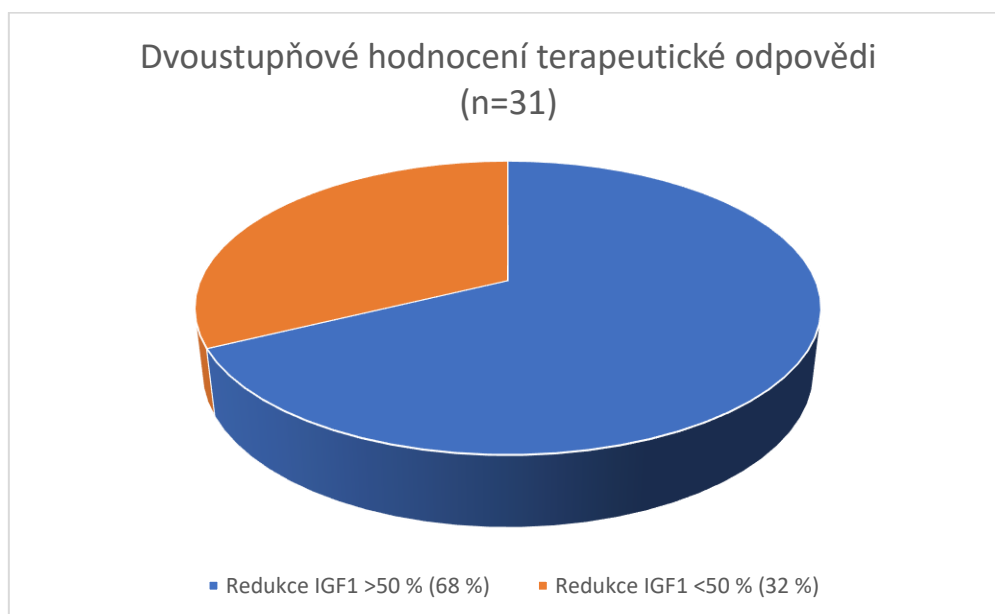
Odpověď na léčbu byla primárně hodnocena čtyřstupňovou škálou. Shrnutí četností odpovědi na léčbu je uvedeno v tabulce 7.34, spolu s mediánem trvání léčby. V grafu č. 7.11 je znázorněno zastoupení pacientů v jednotlivých skupinách čtyřstupňového hodnocení. Pro účely statistické analýzy souboru jsme se dále rozhodli rozdělit soubor na dvě skupiny: pacienty s dobrou odpovědí na léčbu (redukce IGF1 >50%, n=21) a pacienty se špatnou odpovědí na léčbu (redukce IGF1 <50 %, n=10). Zastoupení pacientů na dvoustupňové škále terapeutické odpovědi je znázorněno v grafu č. 7.12. Medián délky léčby ve skupině s dobrou odpovědí představoval 10,6 měsíců, ve skupině se špatnou léčebnou odpovědí pak 10,3 měsíce.

Tabulka 7.34 – Rozsah odpovědi na léčbu ve studované skupině pacientů

	Počet pacientů	Počet pacientů (dvoustupňové hodnocení odpovědi)	Medián délky léčby (měsíce)
Redukce IGF1 <20 %	5 (16 %)	10 (32 %)	13,3
Redukce IGF1 20–50 %	5 (16 %)		7,2
Redukce IGF1 >50 %	10 (32 %)	21 (68 %)	12,8
Normalizace hladiny IGF1	11 (36 %)		9,6



Graf č. 7.11 – Zastoupení terapeutických odpovědí na 4-stupňové škále hodnocení



Graf č. 7.12 – Zastoupení terapeutických odpovědí na 2-stupňové škále hodnocení

#### 7.4.2 Analýza podskupiny pacientů s konkomitantní léčbou dopaminovými agonisty a význam exprese D2DR

Souběžná léčba SSA první generace a cabergolinem byla přítomná u 5 pacientů. Jednalo se o 3 ženy a dva muže ve věku 36 až 55 let (průměrný věk 42,8 let). Délka souběžné léčby byla v průměru 13,4 měsíce, medián tvořil 8,9 měsíce. Ve skupině byly zastoupeny 3 SLT, 1 SGST a 1 plurihormonální tumor. U pacientů se 2 SLT došlo po léčbě k normalizaci hladin IGF1 a tentýž efekt byl přítomen u pacienta s plurihormonálním tumorem. U zbývajících

pacienta s SLT došlo k redukci IGF1 vyšší než 50 % a u pacienta s SGST jsme pozorovali redukci IGF1 v intervalu 20-50 %. Skupina pacientů s kombinační léčbou se od pacientů léčených pouze SSA nelišila expresí D2DR ( $p=0,314$ , Mann-Whitneyův test), který je považován za efektor dopaminové signalizace v těchto tumorech. Nelišila se též expresí prolaktinu ( $p=0,19$ , Mann-Whitneyův test) ani sérovými hladinami prolaktinu v době diagnózy ( $p=0,35$ , Mann-Whitneyův test), ačkoliv oba parametry byly vyšší ve skupině léčené cabergolinem. K bližšímu srovnání možného současného vlivu cabergolinu na léčebnou odpověď jsme se rozhodli zanalyzovat odpověď jednak ve skupině léčené pouze SSA ( $n=26$ ) a dále ve skupině léčené kombinací ( $n=5$ ). Obě skupiny se signifikantně nelišily při použití dvoustupňového hodnocení odpovědi ( $p=1$ , Fisherův přesný test), ani při použití čtyřstupňového hodnocení odpovědi ( $p=0,399$ ,  $\chi^2$ ). Z těchto důvodů jsme se rozhodli pro následující analýzy ze souboru těchto pět pacientů nevyřadit.

#### **7.4.3 Korelační analýza potenciálních terapeutických prediktorů**

Abychom lépe posoudili možný vztah hodnocených veličin a terapeutické odpovědi, rozhodli jsme se provést korelační analýzu mezi jednotlivými stanovenými parametry nádorů a terapeutickou odpovědí hodnocenou pomocí 4-stupňové škály (viz tabulka 7.32) a stanovit Spearmanův korelační koeficient. Jako statisticky signifikantní se ukázala pozitivní korelace mezi léčebnou odpovědí a věkem, ( $\rho=0,39$ ,  $p=0,03$ ), hladinou IGF1 ( $\rho=0,37$ ,  $p=0,042$ ) a expresí SSTR2A ( $\rho=0,39$ ,  $p=0,029$ ). Negativně s léčebnou odpovědí naopak koreloval index Ki67 ( $\rho=-0,535$ ,  $p=0,007$ ), sérová hladina TSH ( $\rho=-0,39$ ,  $p=0,033$ ), největší průměr tumoru ( $\rho=-0,442$ ,  $p=0,015$ ) a objem tumoru ( $\rho=-0,419$ ,  $p=0,027$ ). Další parametry nedosahovaly statistické významnosti.

#### **7.4.4 Analýza potenciálních klinických prediktorů léčebné odpovědi**

V rámci této analýzy jsme se rozhodli posoudit možný vliv věku a dalších laboratorních parametrů na léčebnou odpověď. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.35.

Tabulka 7.35 – Vliv klinických parametrů na léčebnou odpověď

	Dobrá odpověď (±SD)	Špatná odpověď (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	47,27±12,94	35,80±15,52	<b>p=0,039</b> (Studentův t- test)
Hladina STH (µg/l, medián)	50,93±64,76	65,85±70,88	p=0,281 (MW)
Hladina prolaktinu (µg/l, medián)	15,26±732,68	31,93±526,76	p=0,06 (MW)
Hladina TSH (mIU/l, medián)	0,69±1,39	1,06±0,29	p=0,098 (MW)
Hladina IGF1 v době diagnózy (% nad normou pro daný věk, průměr)	393,70±155,90	271,70±120,40	<b>p=0,038</b> (Studentův t- test)
Největší rozměr tumoru (mm, průměr)	21,83±8,25	31,58±8,70	<b>p=0,006</b> (Studentův t- test)
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , medián)	2597,40±7121,07	8011,73±9326,60	<b>p=0,015 (MW)</b>
Invazivita			
Neinvazivní	7	1	
Invazivní	10	5	p=0,37 (Fisherův přesný test)

#### 7.4.5 Analýza histologických prediktorů odpovědi na léčbu

##### 7.4.5.1 Analýza významu exprese somatostatinových receptorů a význam poměrů jednotlivých receptorů

Neboť jsou somatostatinové receptory, a především SSTR2A hlavní efektem účinku SSA, v následující sekci jsme se rozhodli zanalyzovat význam jejich exprese jakožto potenciálního prediktivního ukazatele. V této části jsme se rozhodli analyzovat též expresi D2DR, neboť tento receptor může interagovat se SSTR5 a ovlivňovat tak jeho funkci a celulární kinetiku. Analýza exprese v obou skupinách pacientů je uvedena v tabulce 7.36. Rozdíly v expresi jednotlivých proteinů mezi skupinami pacientů s dobrou a špatnou terapeutickou odpovědí jsou znázorněny v grafu č. 7.13.

##### 7.4.5.2 Analýza významu exprese E-cadherinu

E-cadherin vykazoval v několika studiích prediktivní výpovědní hodnotu pro odpověď na léčbu. V naší studii byla exprese E-cadherinu vyšší ve skupině s dobrou terapeutickou odpovědí (medián 138, SD±95,51) ve srovnání se skupinou se špatnou odpovědí na léčbu (medián 0, SD±55,59). Tento rozdíl byl statisticky signifikantní (p=0,03, Mann-Whitneyův test). Ve skupině se špatnou terapeutickou odpovědí byli pouze dva pacienti z non-SGST podskupiny a jejich H-skóre představovalo 104 a 155.

Tabulka 7.36 – Analýza vlivu exprese somatostatinových receptorů na terapeutickou odpověď

	Dobrá odpověď (±SD)	Špatná odpověď (±SD)	P hodnota, použitý test
H-skóre pro SSTR1 (medián)	0,67±40,14	0,17±17,67	p=0,43 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (průměr)	165,62±66,44	89,53±94,36	<b>p=0,015</b> (Studentův t-test)
H-skóre pro SSTR3 (medián)	70± 53,35	33,05±44,07	p=0,13 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (medián)	65±78,19	78,33±49,16	p=0,87 (MW)
H-skóre pro D2DR (medián)	20±21,34	10±32,08	p=0,81 (MW)

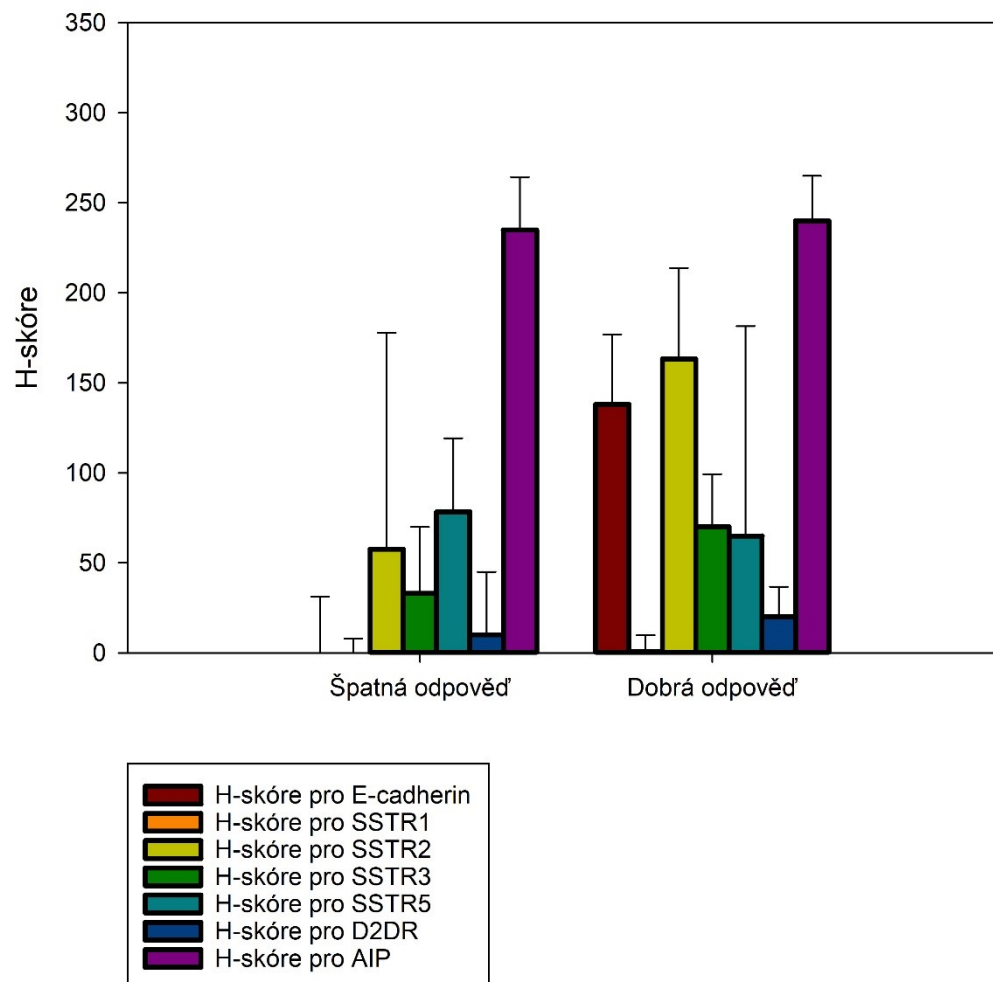
#### 7.4.5.3 Analýza významu exprese AIP

Vzhledem k tomu, že exprese AIP hraje roli v buněčné odpovědi na SSA zprostředkované SSTR, posoudili jsme expresi tohoto proteinu v obou analyzovaných skupinách. Průměrné H-skóre ve skupině pacientů s dobrou terapeutickou odpovědí bylo 238,1 (SD±37,16) a ve skupině se špatnou terapeutickou odpovědí 227 (SD±42,55). Obě skupiny se od sebe exprese AIP signifikantně nelišily (p=0,464, Studentův t-test).

#### 7.4.5.4 Analýza dalších histologických faktorů

Neboť jsme při korelační analýze (sekce 7.4.3) identifikovali souvztažnost mezi Ki67 a odpovědí na léčbu, rozhodli jsme se porovnat skupinu s dobrou a špatnou terapeutickou odpovědí i pro zbývající parametry. Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulce 7.37. Z analýzy Ki67 a proliferativity byly vyřazeni pacienti předléčení SSA. Dále jsme se rozhodli v podskupině nádorů s neoadjuvantní léčbou SSA posoudit vztah biochemické odpovědi a histologických změn v tumorech. V předléčené skupině byli celkem 3 pacienti se špatnou odpovědí na léčbu a 4 pacienti s dobrou odpovědí. 3 pacienti vykazovali změny spojené s terapií (1 tumor se špatnou odpovědí a 2 tumory s dobrou odpovědí) a u zbývajících 4 pacientů (2 s dobrou a 2 se špatnou odpovědí) nebyly změny přítomny; asociace histologických změn s odpovědí na léčbu neměla signifikantní charakter (p=1, Fisherův přesný test).

### H-skóre jednotlivých proteinů ve skupině pacientů s dobrou a špatnou terapeutickou odpovědí



Graf č. 7.13 – Rozdíly v H-skóre studovaných proteinů mezi skupinou pacientů s dobrou a špatnou terapeutickou odpovědí.



Tabulka 7.37 – Analýza vlivu dalších histologických parametrů na terapeutickou odpověď

	Dobrá odpověď (±SD)	Špatná odpověď (±SD)	P hodnota, použitý test
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% medián)	5±32,50	5±8,92	p=0,82 (MW)
Množství βTSH imunoreaktivních buněk (% medián)	0±1,16	0±0	p=0,23 (MW)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% medián)	35±41,70	100±36,50	p=0,07 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% n=24, průměr)	3,03±2,38	4,36±0,893	p=0,17 (Studentův t-test)
Množství mitóz (/10HPF, n=28, medián)	0±0,77	0±1,29	p=0,25 (MW)
Pohlaví			
Muži	14	3	
Ženy	7	7	p=0,12 (Fisherův přesný test)
Exprese p53			
Pozitivní	7	6	
Negativní	11	4	p=0,43 (Fisherův přesný test)
Proliferativita			
Trouillas A	12	2	
Trouillas B	3	5	p=0,05 (Fisherův přesný test)
Grade dle Trouillas			
1a	4	1	
2a	5	0	
1b	2	0	
2b	1	3	P = 0,052 ( $\chi^2$ )

#### 7.4.6 Analýza významu histologického subtypu pro léčebnou odpověď

##### 7.4.6.1 Obecné poznámky k histologické povaze souboru

Z předchozích údajů vyplývá význam E-cadherinu a SSTR2A pro predikci odpovědi na léčbu. Neboť je nízká exprese obou těchto molekul signifikantně častější ve skupině SGST, rozhodli jsme se provést separátní analýzu pro histologické subtypy tumorů. Jelikož však množství případů v jednotlivých kategoriích non-SGST neumožňovalo reprezentativní statistické hodnocení, rozhodli jsme se vyhodnotit tuto skupinu pacientů dohromady. Autor opodstatňuje tento krok skutečností, že se tyto tumory v předchozí analýze navzájem lišili pouze minimem klinických a patologických parametrů (viz tabulky 7.17 a 7.21). Součástí podsouboru byl dále jeden tumor klasifikovaný jako plurihormonální Pit1+ tumor. Jednalo se o případ č. 4

z tabulky 7.15; pacient vykazoval dobrou terapeutickou odpověď, jež vedla k redukci IGF1 o více než 50 %, nicméně nevedla k úplné normalizaci. Vzhledem k spornému zařazení tohoto tumoru jsme se pacienta rozhodli z analýzy vlivu histologického subtypu na léčebnou odpověď vyřadit. Obecné porovnání léčebné odpovědi mezi oběma podskupinami je uvedeno v tabulce 7.38.

Tabulka 7.38 – Terapeutická odpověď v závislosti na histologickém subtypu tumoru

Skupina	Dobrá odpověď	Špatná odpověď	
SGST	8	8	
Non-SGST	12	2	p=0,06 (Fisherův přesný test)

#### 7.4.6.2 Odpověď na léčbu u pacientů s SGST

V našem podsouboru bylo celkem 16 pacientů s SGST. U 5 pacientů (31 %) došlo k redukci IGF1 o méně než 20 %, u 3 pacientů (19 %) byla dosažena redukce mezi 20 a 50 %, u 3 pacientů (19 %) byla dosažena redukce hladiny IGF1 o >50 % a u 5 pacientů (19 %) došlo k normalizaci hladin IGF1. Na dvoustupňové škále hodnotící odpověď tedy 8 pacientů vykazovalo dobrou a 8 špatnou odpověď na léčbu. Odlišnosti těchto dvou podskupin jsou shrnuty v tabulce 7.39. Vzhledem k množství pacientů jsme v této analýze netestovali význam kompletního grade dle Trouillas, který byl dostupný pouze u 8 případů.

#### 7.4.6.3 Odpověď na léčbu u pacientů s non-SGST

V námi studované podskupině bylo celkem 14 pacientů s non-SGST. Jednalo se o 4 pacienty s DGST, 9 pacientů s SLT a 1 pacienta s plurihormonálním tumorem. Odpověď na léčbu byla v této skupině lepší oproti SGST: u dvou pacientů (SLT a DGST) došlo k redukci IGF1 v pásmu 20 – 50 %, u 6 pacientů (3 DGST a 3 SLT) došlo k redukci IGF1 o více než 50 % a u 6 pacientů došlo k úplné normalizaci hodnot IGF1 (5 SLT a 1 plurihormonální tumor). Neboť distribuce léčebných odpovědí (špatná odpověď u 2 pacientů a dobrá odpověď u 12 pacientů) neumožňovala smysluplnou statistickou analýzu, rozhodli jsme se v této podskupině srovnat pacienty, jež dosáhli úplné normalizace hladin IGF1 (n=6) s pacienty, u nichž k normalizaci nedošlo (n=8). Analýza klinických a patologických parametrů obou podskupin je uvedena v tabulce 7.40. Vzhledem k množství pacientů jsme v této analýze netestovali význam kompletního grade dle Trouillas, který byl dostupný pouze u 8 případů.

Tabulka 7.39 – Analýza prediktivních faktorů ve skupině SGST

	Dobrá odpověď (±SD)	Špatná odpověď (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, medián)	47,50±9,13	29±16,25	<b>p=0,01 (MW)</b>
Hladina STH (µg/l, medián)	12,92±45,19	48,73±79,10	p=0,19 (MW)
Hladina prolaktinu (µg/l, medián)	11,28±1179,18	31,93±521,19	p=0,28 (MW)
Hladina TSH (mIU/l, n=15, medián)	0,54±2,19	1,15±0,23	p=0,07 (MW)
Hladina IGF1 v době diagnózy (% nad normou pro daný věk, průměr)	377±128	263±85	p=0,06(Studentův t-test)
Největší rozměr tumoru (mm, průměr)	20,08±6,94	34,23±7,55	<b>p=0,002 (Studentův t-test)</b>
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , n=15, medián)	2227,70±2339,75	12184,70±9377,56	<b>p=0,002 (MW)</b>
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% , medián)	3±2,15	5±5,29	p=0,50 (MW)
Množství βTSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0±0	0±0	p=1 (MW)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% , medián)	100±11,60	100±4,63	p=0,88 (MW)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , n=14, průměr)	2,039±1,43	4,36±0,89	<b>p=0,004 (Studentův t-test)</b>
Množství mitóz (/10HPF, n=15, medián)	0±0,49	0,50±1,36	p=0,34 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (medián)	0±52,77	0±2,48	p=0,72 (MW)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	0,83±5,18	0,01±18,81	p=0,19 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (průměr)	137,50±76,93	55,88±65,08	<b>p=0,038 (Studentův t-test)</b>
H-skóre pro SSTR3 (průměr)	59,46±37,24	53,40±47,13	p=0,78 (Studentův t-test)
H-skóre pro SSTR5 (průměr)	119,50±96,77	86,75±52,52	p=0,41 (Studentův t-test)
H-skóre pro D2DR (medián)	15±22,16	13,33±33,70	p=0,72 (MW)
H-skóre pro AIP (průměr)	225±33,93	226,56±45,26	p=0,94(Studentův t-test)
Pohlaví			
Muži	6	2	
Ženy	2	6	p=0,13 (Fisherův přesný test)
Exprese p53			
Pozitivní	4	5	
Negativní	3	3	p=1 (Fisherův přesný test)

Proliferativita			
Trouillas A	4	2	
Trouillas B	1	5	p=0,24 (Fisherův přesný test)
Invaze			
Neinvazivní	1	3	
Invazivní	4	4	p=0,58 (Fisherův přesný test)

Tabulka 7.40 – Prediktivní vliv klinických a patologických faktorů na normalizaci IGF1 u pacientů s non-SGST

	Normalizace IGF1 (±SD)	Bez normalizace IGF1 (±SD)	P hodnota, použitý test
Věk (roky, průměr)	45,33±10,65	46,63±17,23	p=0,88 (Studentův t-test)
Hladina STH (µg/l, medián)	55,82±100,64	88,09±43,87	p=0,66 (MW)
Hladina prolaktinu (µg/l, medián)	82±91,55	15,58±352,80	p=0,35 (MW)
Hladina TSH (mIU/l, průměr)	0,73±0,27	0,84±0,65	p=0,69 (Studentův t-test)
Hladina IGF1 v době diagnózy (% nad normou pro daný věk, průměr)	4,33±2,15	3,59±1,74	p=0,49 (Studentův t-test)
Největší rozměr tumoru (mm, n=13, průměr)	22,80±5,93	23,38±10,34	p=0,91 (Studentův t-test)
Objem tumoru (mm <sup>3</sup> , n=12, medián)	2912±3638,58	2667,60±10555,10	p=0,88 (MW)
Množství prolaktin imunoreaktivních buněk (% , průměr)	48,30±36,10	20,60±30,70	p=0,15 (Studentův t-test)
Množství βTSH imunoreaktivních buněk (% , medián)	0±0,08	0±0,30	p=0,85 (MW)
Množství buněk s fibrózními tělísky (% , průměr)	30±21,20	9,38±13,20	p=0,05 (Studentův t-test)
Množství Ki67 imunoreaktivních buněk (% , n=10, průměr)	2,34±1,74	4,52±3,36	p=0,23 (Studentův t-test)
Množství mitóz (/10HPF, n=13, medián)	0±0	0±1,13	p=0,45 (MW)
H-skóre pro E-cadherin (průměr)	171,18±52,32	167,13±60,09	p=0,89 (Studentův t-test)
H-skóre pro SSTR1 (medián)	0,26±19,59	9,84±59,95	p=0,18 (MW)
H-skóre pro SSTR2A (průměr)	197,56±65,44	184,71±56,18	p=0,7 (Studentův t-test)
H-skóre pro SSTR3 (medián)	65,52±49,74	49,7±74,15	p=0,95 (MW)
H-skóre pro SSTR5 (průměr)	114,50±57,73	38,46±36,84	<b>p=0,011 (Studentův t-test)</b>
H-skóre pro D2DR (průměr)	14,42±12,63	23,13±27,77	p=0,49 (Studentův t-test)
H-skóre pro AIP (průměr)	258,75±44,21	231,88±32,78	p=0,21

			(Studentův t-test)
Pohlaví			
Muži	4	4	
Ženy	2	4	p=0,63 (Fisherův přesný test)
Exprese p53			
Pozitivní	1	3	
Negativní	5	4	p=0,56 (Fisherův přesný test)
Proliferativita			
Trouillas A	5	3	
Trouillas B	0	2	p=0,44 (Fisherův přesný test)
Invaze			
Neinvazivní	3	1	
Invazivní	2	5	p=0,24 (Fisherův přesný test)

*„Nejhorší jsou však malé myšlenky. To raději už páchat zlo, než myslet přikrčeně!“  
- Friedrich Nietzsche, Tak pravil Zarathustra*

## **8. Diskuse**

### **8.1 Úvodní poznámky k interpretaci výsledků**

V předchozí části práce byla provedena extenzivní charakterizace a analýza kohorty 110 pacientů se somatotrofními PitNETy. V nadcházející části budou tyto výsledky blíže rozebrány a interpretovány v souvislosti s dalšími publikovanými poznatky. Před tímto krokem je nutné doplnit několik poznámek. Na dvou místech studie (7.3.2 a 7.3.4.6) jsme se rozhodli k analýze dat využít korelační analýzu. Autor si je vědom velmi omezené výpovědní hodnoty této metody bez následujícího ověření multiparametrickou regresí, a proto je těmto údajům v nadcházející části přikládána funkce pomocného vodítka a explorativní metodiky, spíše nežli definitivního potvrzení možných vztahů mezi veličinami.

Druhá poznámka se týká laboratorních hodnot hormonů stanovovaných v této studii. Zatímco hladiny STH, IGF1 a prolaktinu se u různých pacientů pohybovaly nad normou limitů pro daný věk a rozsah těchto hladin je plně kompatibilní s diagnózou akromegalie, hladina TSH se u dostupných případů pohybovala v rozmezí od 0,04 do 3,26 mIU/l, s jediným případem v celé kohortě dosahujícím hodnoty 6,84 mIU/l. Hladiny TSH ale figurovaly jako statisticky významný parametr v některých analýzách. Horní hranice referenční hodnoty sérového TSH je 4 mIU/l, přičemž z tohoto rozmezí tedy vybočoval pouze jediný pacient. Hladiny TSH jsou modifikovány funkční aktivitou štítné žlázy, která nemusí nijak souviset s vlastní akromegalií, a dále může hladinu TSH ovlivňovat jakýkoliv tumor hypofýzy útlakem reziduálního funkčního parenchymu (centrální hypothyreóza). Z těchto důvodů je nutné pohlížet na závěry vztahující se k sérové hladině TSH s velkou rezervou, neboť se jednalo pouze o laboratorní odchylky bez klinické manifestace v podobě hyperthyreózy a dále je nelze s jistotou vztáhnout k vlastní sekreční aktivitě tumorů.

### **8.2 Epidemiologické parametry studované kohorty, vliv pohlaví a věku pacientů na klinickopatologické parametry tumorů**

Všichni pacienti zastoupení ve studii byli definováni klinicky přítomností symptomů akromegalie. Soubor tedy nezahrnoval klinicky němé somatotrofní tumory. Průměrný věk pacientů v naší studii byl 48,2 let, přičemž zastoupení mužů a žen bylo srovnatelné (50,9 % a respektive 49,1 %). Tyto údaje jsou v souladu s daty z britského registru (průměrný věk 47,4

let, ženy 49,7 % a muži 50,3 %)(175) a jen o několik let vyšší ve srovnání s průměrným věkem (45,2 roku) v metaanalýze dat z několika národních registrů(204). Věkové složení se též výrazněji nelišilo od dalších patologických studií (22, 24, 26, 59, 146). V některých pracích bylo patrné vyšší zastoupení žen (24, 26, 59) a lehkou převahu žen ve skupině pacientů s akromegalií uvádí též metaanalýza dat národních registrů(204). Průměrný největší rozměr tumorů byl 20 mm. Mikrotumory tvořily 12,5 %, makrotumory tvořily 83,6 % a obří tumory tvořily 3,9 % celého souboru; zastoupení makrotumorů bylo tedy oproti jiným studiím vyšší (63-75 %) (22, 26, 59, 204), v jiných však bylo srovnatelné (24, 205). Neboť patologické studie odráží určitý výběr pacientů, kteří byli na daném pracovišti operováni, případně se množství pacientů v jednotlivých kategoriích může odlišovat podle designu studie, lze považovat radiologická data a data z národních registrů týkající se velikosti (zde se údaje pohybují mezi 75–85 % makrotumorů v (204, 205)) za spolehlivější reprezentaci opravdového populačního zastoupení jednotlivých velikostních kategorií. V těchto ohledech (věk, pohlaví, velikost tumorů) tedy naše práce výrazněji nevybočovala z řady ostatních obdobných prací. S velikostí tumorů je spojena též přítomnost invaze okolních struktur, definovaná v naší práci jako invaze sinus cavernosus dle Knospovy klasifikace (Knosp 3 a Knosp 4). Údaj o invazi byl dostupný u celkem 83 pacientů: celkem 28 pacientů (33,7 %) mělo invazivní tumor a tento údaj je srovnatelný s jinými patologickými studiemi, kde se frekvence invaze pohybovala mezi 22–50 % (22, 26, 148, 199), i s radiologickými pracemi (205). Invazivní tumory byly signifikantně větší ( $p=0,005$ ), přičemž rozdíl mezi průměry tumorů v invazivní a neinvazivní skupině představoval 5,14 mm.

Analýza vztahu věku, pohlaví a dalších klinickopatologických charakteristik poskytla pouze omezené informace. Věk pacientů pozitivně koreloval s hladinami IGF1, a naopak negativně koreloval s velikostí tumorů a sérovou hladinou STH; výsledky této korelace je nicméně nutné i přes statistickou signifikanci brát s rezervou, neboť korelační koeficienty byly ve všech případech poměrně nízké ( $r_{\text{největší}}=|0,26|$ ). Trend k větším tumorům u mladších pacientů může částečně ilustrovat přítomnost SGST podskupiny v našem souboru; pacienti s SGST byli v naší studii signifikantně mladší ve srovnání s non-SGST podskupinou, obdobně jako v některých publikovaných studiích (22, 25, 26, 59), přestože asociace SGST s nižším věkem nebyla prokázána ve všech pracích(24, 81, 133). V rámci naší kohorty byl sice patrný pouze trend ( $p=0,07$ ) k větší velikosti nádorů v SGST podskupině, avšak asociace mezi větší velikostí a SGST subtypem byla opakovaně prokázána v jiných studiích (22, 26, 59, 81, 133). Vlastní korelace mezi věkem a velikostí měla poměrně malý koeficient ( $r=-0,21$ ) a mohla by

tedy ilustrovat tento trend, který v dalších analýzách nádorových subtypů již nedosáhl statistické signifikance. Interpretace pozitivní závislosti hladin IGF1 a negativní závislosti hladin STH je v tomto případě obtížnější. V naprosté většině dostupných pramenů se skupiny pacientů s SGST a non-SGST nijak signifikantně nelišily hladinou IGF1 ani STH (22, 24, 26, 62, 133). Hladiny STH ve skupině non-SGST obvykle pozitivně korelují s objemem tumoru, tato souvislost mezi objemem tumoru a hladinou STH nebyla opakovaně prokázána u SGST (26, 68). SGST ve srovnání s ostatními subtypy produkují méně STH a IGF1 na jednotku objemu tumoru (62, 69). Vzhledem k největší míře asociace STH a věku ve skupině DGST ( $r=-0,391$ ), nikoliv ovšem SGST, nelze vyloučit, že se na tomto vztahu podílí skupina mladších pacientů s většími non-SGST tumory a že trend k větším tumorům v mladším věku existuje nezávisle na dichotomii klasifikace na SGST a non-SGST. Tato možnost je však poměrně obtížně prokazatelná, neboť většina dostupných studií se blíže nezabývala věkovou skladbou non-SGST a vztahem věku a dalších klinických parametrů. Paradoxní se pak v tomto ohledu může jevit opačná asociace mezi věkem a hladinami IGF1 ( $r=0,2$ ) v celém souboru, tento nálezn by ale mohl být opět v souladu s častějším výskytem non-SGST ve vyšších věkových skupinách, neboť jak bylo zmíněno výše, non-SGST a především DGST vykazují vyšší produkci IGF1 na jednotku objemu tumoru (62, 69). Dalším možným vysvětlením, kromě odlišností ve věkové distribuci a biochemických vlastnostech jednotlivých nádorových podtypů, může být odlišná citlivost jater na stimulaci STH, jež byla popsána např. u mladších žen. Ženy vykazují nižší senzitivitu k STH, jež se pak promítá do nižší jaterní produkce IGF1 (206, 207), přičemž tento rozdíl je patrný jen u mladších pacientek, zatímco ve vyšším věku (>50 let) se profil produkce IGF1 mezi muži a ženami neliší (207). Současně byla u mladších žen (<45 let) s akromegalií popsána vyšší produkce STH, ve srovnání s mužskými pacienty (208). Ačkoliv byly ženy v našem souboru starší nežli muži, průměrný věk se u tohoto pohlaví pohyboval okolo 51 let a je tedy možné, že vztah mezi věkem, IGF1 a hladinami STH byl částečně ovlivněn přítomností demografické podskupiny mladších žen s vyššími hladinami STH a současně nižší produkcí IGF1 v játrech, přičemž tento výsledek se vzhledem k relativně malé velikosti korelačních koeficientů nemusel promítnout do dalších provedených analýz. Tyto závěr mají ovšem spekulativní charakter a vzhledem k tomu, že jsou odvozeny z korelační analýzy s poměrně nízkými korelačními koeficienty, nelze vyloučit, že se jedná pouze o náhodný, statisticky nevýznamný jev.



Analýza vztahu mezi pohlavím pacientů a klinicko-patologickými vlastnostmi tumorů přinesla několik poznatků: muži v našem souboru byly v průměru o 6 let mladší a jejich nádory exprimovaly signifikantně více SSTR2A, ačkoliv se vlastní hodnota H-skóre lišila o pouhých 22 bodů a z praktického pohledu je tedy tato odlišnost nejspíše zanedbatelná. Jiné parametry nedosáhly statistické signifikance, ačkoliv byl přítomen trend k častější expresi  $\beta$ TSH u žen a k častější pozitivitě p53 u mužů. Naše práce nezaznamenala asociaci mezi pohlavím a histologickým podtypem tumoru, v souladu s jinými publikacemi (22, 24, 62), na rozdíl od několika prací poukazujících na častější výskyt SGST u žen (26, 59). S výjimkou věku jsme tedy nenalezli jiný parametr výrazněji asociovaný s pohlavím. Příčina tohoto nálezu přitom není spolehlivě vysvětlitelná, k obdobnému závěru však dospěly i další epidemiologické studie a tento nález se týká též celého vlastního registru RESET (209).

### **8.3 Histologická subtypizace vyšetřených nádorů**

Schéma histologické subtypizace nádorů bylo navrženo v souladu s platnými doporučeními WHO shrnutými v klasifikaci nádorů endokrinního systému z roku 2017 a dále s doporučeními European Pituitary Pathology Group (EPPG), zájmového uskupení patologů zabývajících se patologií hypofyzárních tumorů (16). V rámci těchto klasifikačních schémat jsou poměrně exaktně definovány jednotky DGST, SGST, somatotropních-laktotropních tumorů a mammosomatotropních tumorů. Problematickou nicméně i nadále zůstává terminologie a klasifikace nádorů s koexpresí  $\beta$ TSH, klasifikace cytokeratin-negativních tumorů a přesné vymezení jednotky plurihormonálního Pit1<sup>+</sup> tumoru.

Koexprese  $\beta$ TSH v somatotropních nádorech koresponduje s plurihormonální diferenciací tumoru, přičemž tato koexprese není a priori něčím neobvyklým, vzhledem k příslušnosti thyreotropních tumorů k Pit1 buněčné linii. EPPG navrhuje označovat tumory s manifestním hyperthyroidismem a koexpresí dalších hormonů Pit1 linie jakožto thyreotropní anebo somatotropní Pit1<sup>+</sup> plurihormonální tumory, v závislosti na endokrinologické manifestaci nádoru, přičemž u obou těchto jednotek by měla být přítomná centrální hypertyreóza (16). Otázkou tedy zůstává význam klinicky němé exprese  $\beta$ TSH v tumorech. Současně žádná z dostupných klasifikací nestanovuje konkrétní množství  $\beta$ TSH<sup>+</sup> buněk, nutných pro klasifikaci tumoru jako plurihormonálního. EPPG konstatuje, že by se nemělo jednat o náhodně zavzaté buňky normální hypofýzy a v případě exprese prolaktinu stanovila limit 10 % (16). Soulad v tomto ohledu nepanuje ani v publikované literatuře: některé starší studie použily jako cut-off hodnotu 5 % (80) anebo 1 % (22) pro prolaktin i  $\beta$ TSH, jiná práce

naopak pouze procentuálně hodnotila množství imunoreaktivních buněk v 500 buňkách tumoru(24) a jiná studie přesnou metodiku kvantifikace neuvádí(26). Vzhledem k absenci konsenzu a z důvodů explorativního pojetí této studie se autor přiklonil k senzitivnější hodnotě 1 %. Tato volba má i svá další opodstatnění: v literatuře jednak existují pochybnosti nad senzitivitou používaných polyklonálních protilátek proti  $\beta$ TSH(210), buňky s expresí  $\beta$ TSH, jež autor identifikoval v některých případech, měly jednoznačnou morfolologii buněk tumoru a to i přesto, že se jejich množství obvykle pohybovalo hluboko pod hranicí 10 %, a konečně, v případě jednotky plurihormonálního Pit1+ tumoru se velmi často v tumorech vyskytují ojedinělé  $\beta$ TSH<sup>+</sup> buňky, jež jsou nicméně považovány za známku bona fide tyreotropní diferenciace tumoru(29), přičemž tento nález dále podporují molekulárně genetické studie z poslední doby (211) a exprese GATA3 v těchto tumorech, jakožto transkripčního faktoru spojeného s tyreotropní diferenciací(18). Nádory s koexpresí  $\beta$ TSH představovaly cca 5 % případů v souboru 242 somatotropních PitNETů(26), zatímco jiné zdroje uvádí srovnatelnou hodnotu 3 – 6 % (15), 8,65 %(22) anebo 10,6 % případů(79). Obecně lze tedy říct, že exprese  $\beta$ TSH v somatotropních tumorech je relativně vzácná. V naší kohortě jsme identifikovali expresi  $\beta$ TSH (v rozsahu  $\geq 1$  % buněk) celkem v 20 tumorech, tedy přibližně v dvojnásobném množství případů (18,2 %). Příčinou tohoto nálezu je dle autora poměrně nízký cut-off pro pozitivitu buněk, a to jak kvantitativní (jenž je ovšem srovnatelný s výše citovanými studiemi), tak kvalitativní. Imunohistochemická metodika je do určité míry zatížena subjektivitou při hodnocení, a to především při hodnocení síly pozitivní reakce. Intenzita reakce s  $\beta$ TSH antisérem se v jednotlivých případech lišila a v některých nádorech byla poměrně slabá, nicméně ji autor nepovažoval za artefakt metody vzhledem k distribuci positivity pouze v části morfologicky dobře definovaných nádorových buněk. Poměrně neobvyklým nálezem v kontextu literárních pramenů byla identifikace exprese  $\beta$ TSH v podskupině SGST exaktně definovaných množstvím fibrózních tělísek – jednalo se celkem o 19 % tumorů (8/42). Exprese  $\beta$ TSH nebyla identifikována ani v jednom z celkem 346 SGST(22, 26), ačkoliv jiná studie v kohortě 141 tumorů naopak neprokázala statisticky signifikantní odlišnosti mezi množstvím  $\beta$ TSH<sup>+</sup> buněk u SGST a non-SGST podskupiny(24). Neboť byl tento nález překvapivý, rozhodli jsme se porovnat skupiny  $\beta$ TSH<sup>+</sup> a  $\beta$ TSH<sup>-</sup> SGST a zjistili jsme, že jedinými třemi signifikantně odlišnými parametry byla častější exprese prolaktinu a D2DR v  $\beta$ TSH<sup>+</sup> skupině a dále vyšší sérová hladina TSH v  $\beta$ TSH<sup>+</sup> skupině. Tento nález dle našeho názoru podporuje závěr, že i přes místy spornou intenzitu  $\beta$ TSH positivity se nejedná o artefakt imunohistochemické reakce, neboť uvedené výsledky ilustrují

častější „plurihormonální“ fenotyp těchto tumorů a odráží se též v sérových hladinách TSH ( $p=0,009$ ). Tento závěr je dále podporován nedávnou studií zabývající se molekulárním profilem PitNETů, která pomocí shlukové analýzy na úrovni expresního profilu transkripčních faktorů identifikovala obdobnou expresní signaturu u SGST podskupiny, podskupiny thyreotropních tumorů a PPPT(211). V tomto ohledu (a spolu s dále diskutovanou problematikou PPPT) je nutné ještě doplnit, že ačkoliv byla exprese  $\beta$ TSH častější v podskupině větších SGST (viz tabulka 7.27), nedosahoval tento nálezn statistické signifikance ( $p=0,08$ ) a dále nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi velikostí tumorů ani při srovnání  $\beta$ TSH<sup>+</sup> a  $\beta$ TSH<sup>-</sup> podskupin SGST ani v korelační analýze a tyto výsledky tedy nepodporují vyšší agresivitu plurihormonálních SGST ve srovnání se zbytkem SGST podskupiny.

Dalším problematickým bodem naší studie byla přítomnost celkem 9 tumorů (8,2 %) bez identifikovatelné exprese cytokeratinových intermediárních filament (cytokeratin 18, cytokeratin 8/18 a cytokeratin AE1/3). Přítomnost cytokeratin-negativních tumorů je v literatuře známá, nebyla nicméně blíže studována. V souboru 242 tumorů bylo celkem 13 případů (5,4 %) cytokeratin negativních; část těchto tumorů exprimovala pouze STH, část byla plurihormonální. Studie zaznamenala větší velikost těchto nádorů spolu s nižšími sérovými hladinami STH, avšak neposkytla další bližší charakteristiku(26). Další studie identifikovala 5 těchto tumorů, které subklasifikovala jako SGST bez bližšího rozboru(80) a v práci zabývající se výhradně PPPT byly celkem 3/31 tumorů cytokeratin negativní(29). Obdobné případy se bez hlubšího povšimnutí autorů vyskytly i v dalších studiích(145, 148). Vzhledem k nedostatku literárních údajů jsme provedli v sekci 7.3.4.1 detailní morfologický a imunohistochemický rozbor těchto případů. Fenomén absence cytokeratinů nevykazoval spojitost s nezávislými klinickými faktory (věk, pohlaví, předchozí farmakologická léčba) a nádory se nelišily ani žádnými jinými klinickými či patologickými parametry od zbytku souboru. Při porovnání se skupinou SGST a non-SGST byla patrná exprese E-cadherinu na úrovni SGST a exprese SSTR2A na úrovni non-SGST. Vysvětlení tohoto fenoménu poskytl bližší morfologický rozbor cytokeratin-negativních tumorů: dva nádory vykazovaly zcela typickou morfologii a imunofenotyp DGST a další tři tumory odpovídaly v tomto duchu SLT podskupině. Zbývající 4 tumory vykazovaly morfologii a imunofenotyp (nízká exprese E-cadherinu, fokální pozitivita STH) kompatibilní s SGST. Vzhledem k přítomnosti  $\beta$ TSH anebo GATA3 ve třech ze čtyř případů jsme však tyto tumory, s výjimkou jediného, klasifikovali jako PPPT. Pro účely dalších analýz jsme je nicméně zahrnuli do podskupiny

SGST. Rozbor tohoto postupu je diskutováno dále. Na podkladě výše uvedeného se autor domnívá, že cytokeratin-negativní tumory jsou heterogenní biologická skupina (což ilustruje i výše popsáná exprese E-cadherinu a SSTR2A), bez charakteristických biologických vlastností a lze ji dále klasifikovat podle morfologie a imunofenotypu.

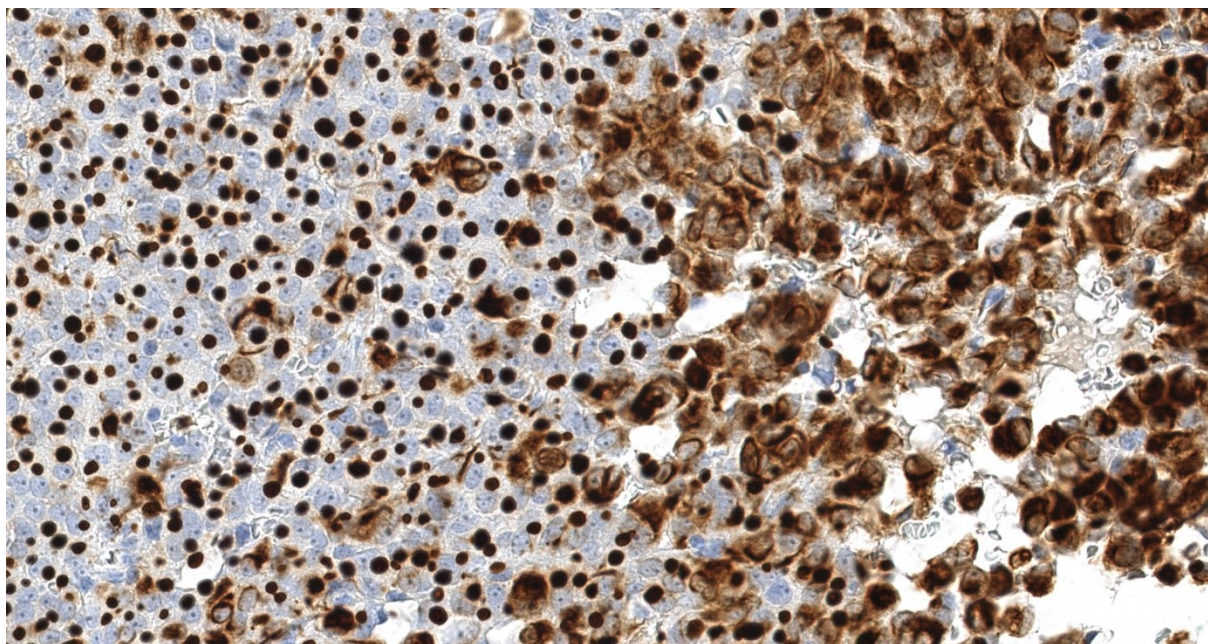
Poslední problematikou zasluhující podrobnější rozbor je výskyt nádorů klasifikovatelných jako plurihormonální Pit1<sup>+</sup> tumory (PPPT). Tyto nádory byly popsány v 80. letech na podkladě specifického morfologického (difúzně rostoucí tumory tvořeny drobnými, uniformními, chromofobními buňkami) a především ultrastrukturálního obrazu s přítomností objemných cisteren Golgiho systému a jadernými pseudoinkluzemi – sferidii. Vzhledem k endokrinologicky tiché manifestaci ve většině případů byla jednotka pojmenována tichý adenom, subtype 3 (silent subtype 3 adenoma)(212). Později se prokázala příslušnost těchto nádorů k Pit1<sup>+</sup> linii(29), což dobře ilustrovala jednak imunohistochemická pozitivita hormonů z Pit1 linie ve variabilním, obvykle ovšem velmi malém počtu buněk v tumoru a dále symptomatická akromegalie (v 12,3 %, 10/81 případů), hyperprolaktinémie anebo hypertyreóza v části případů. Tumor je vzácný, vyznačuje se výskytem u mladších pacientů, větší velikostí, častější invazí do okolních struktur a častějšími recidivami(29, 31, 32), především oproti jiným klinicky nefunkčním tumorům(21, 30). Jiné somatotropní tumory, především SGST, mohou být též klinicky tiché(80), avšak vyznačují se typickou přítomností fibrózních tělísek ve více než 70 % buněk(22). PPPT dále často exprimuje GATA3, což podporuje tyreotropní diferenciaci tumoru, přičemž je nutno zmínit, že exprese GATA3 nebyla v kontextu SGST dosud extenzivněji zkoumána(18). Neboť je SGST subtype považován za klinicky agresivní, obdobně jako PPPT, zůstává otázkou, nakolik se od sebe tyto dvě skupiny biologicky odlišují, především pak v případě klinicky funkčních tumorů. Obě jednotky navíc vykazují příbuznost na podkladě shlukové analýzy exprese transkripčních faktorů(211). Jediná rozsáhlejší studie zabývající se problematikou tichých somatotropních tumorů poukázala právě na význam absence klinické akromegalie ve vztahu k biologickým parametrům tumorů, kdy plurihormonální tumory bez akromegalie se vyznačovaly signifikantně nižším věkem, větší velikostí a vyšším indexem Ki67, ve srovnání s klinicky manifestními plurihormonálními tumory, přičemž ve skupině plurihormonálních, klinicky funkčních tumorů byly zastoupeny též SGST (80). Jedná se mimochodem o tutéž studii, jež do podskupiny SGST zahrnula 5 tumorů s negativním průkazem cytokeratinů, ačkoliv se k této problematice následně dále nevyjadřovala. Dle autora výše uvedené poznatky (signifikanční prognostický význam absence akromegalie oproti symptomatickým případům,

biologická příbuznost PPPT a SGST, absence spolehlivých údajů o rozdílném klinickém chování PPPT a SGST) podporují rozhodnutí zahrnout tyto 3 tumory pro účely dalších analýz v předkládané práci ke skupině SGST. Tuto volbu dále podtrhuje absence exprese E-cadherinu ve všech třech tumorech, neboť absence exprese E-cadherinu byla v naší práci i v jiných studiích silně asociována s SGST subtypem (blíže viz sekce 7.3.4.3 a 4.8.3). Nutné je poznamenat, že exprese E-cadherinu nebyla u PPPT v literatuře zkoumán a tento nálezn může sám osobě dále ilustrovat biologickou spřízněnost obou jednotek. Vzhledem k významu klinické manifestace u těchto tumorů se autor dále nezabýval podskupinou plurihormonálních tumorů, jež navíc nevykazovala morfologii očekávanou u PPPT. Problematika vymezení jednotky PPPT u funkčních tumorů je ostatně ilustrována skutečností, že PPPT nebyl identifikován ani v jednom z 487 případů ve třech velkých studiích(22, 24, 26). Na závěr je ještě nutné doplnit, že samotná absence exprese cytokeratinů není charakteristickým znakem PPPT a v jedné z největších dostupných studií se vyskytla pouze v 9 % případů(29).

V rozsahu studie jsme žádný z analyzovaných případů neklasifikovali jako acidofilní tumor z kmenových buněk; tato skutečnost není zcela překvapivá, neboť tyto sami o sobě vzácné tumory se pouze ojediněle projevují akromegalií (cca 0,8 % všech případů akromegalie(15), viz též tabulka 4.3). Tento nálezn ilustruje i fakt, že minimálně dvě velké studie (n=141 a n=242) neidentifikovali ve svém souboru ani jeden z těchto tumorů(24, 26).

#### **8.4 Klinickopatologický fenotyp jednotlivých histologických subtypů**

Naše studijní kohorta zahrnovala celkem 45 případů SGST (41 %, včetně tří plurihormonálních Pit1<sup>+</sup> tumorů), 29 případů DGST (26 %), 26 případů SLT (24 %) a 10 plurihormonálních tumorů (9 %). Frekvence výskytu SGST byla v jiných pracích nižší a představovala 13 – 30 %(22, 24, 26) a toto číslo se blíží i údajům z literárního přehledu, jež uvádí frekvenci výskytu SGST u cca 20 – 30 % případů akromegalie(15). Příčina tohoto nálezu není zcela zřejmá a může se buďto jednat o lokální epidemiologickou variaci anebo náhodný výsledek vzniklý na podkladě dostupnosti pouze části vzorků z registru. Všechny studie zabývající se detailněji morfologií exprese cytokeratinových filament v somatotropních tumorech zaznamenali přítomnost skupiny tumorů vyznačující se směsí buněk s perinukleární pozitivitou a fibrózními tělísky, v různém poměru (22, 24, 26, 59, 62). Tato skupina tumorů (tzv. „intermediate“, „transitional“ anebo „mixed group“) byla obvykle definována přítomností fibrózních tělísek v 30 – 70 % buněk a vyznačovala se klinickopatologickými charakteristikami srovnatelnými se skupinou nádorů s převažující perinukleární expresí cytokeratinu (obrázek 8.1).



Obrázek 8.1 – Expresse cyokeratinu 18 vykazovala v některých tumorech oba vzory exprese. Na pravé straně obrázku jsou fibrózní tělíska, zatímco v levé části převládá perinukleární lokalizace (400x zvětšení)

Opakovaně byla nicméně v těchto tumorech zaznamenána nižší exprese SSTR2A(62), E-cadherinu (24, 62) a častější exprese prolaktinu(24), ačkoliv v práci (24) neměly tyto rozdíly signifikantní charakter. V naší studii jsme se blíže touto problematikou nezabývali, vzhledem k opakované absenci klinického významu identifikace intermediární skupiny ve výše citovaných pramenech. Nutné je pouze uvést, že zatímco ve většině případů bylo odlišení obou skupin (SGST a non-SGST) přímočaré, objevilo se několik případů, kde se množství buněk s fibrózními tělisky pohybovalo v intervalu 60–80 % a tyto případy byly po morfologické stránce obtížně klasifikovatelné. Poměrně neobvyklým nálezem byla negativní korelace mezi množstvím fibrózních tělísek a objemem tumorů ve skupině non-SGST, signifikantní v podskupinách SLT a plurihormonálních tumorů; tento nález nebyl nicméně potvrzen další analýzou zabývající se vztahem jednotlivých patologických parametrů a velikostí nádorů v jednotlivých histologických podskupinách, ačkoliv i zde vykazovaly nádory s menším množstvím fibrózních tělísek trend k větší velikosti. Dále jsme našli signifikantně vyšší celkové množství fibrózních tělísek ve skupině SLT, oproti jiným podskupinám non-SGST ( $p=0,001$ ). V plurihormonálních tumorech se množství fibrózních tělísek pohybovalo mezi skupinami SLT a DGST a nevykazovalo statistickou odlišnost. Obdobný nález byl patrný též ve výsledcích dvou dalších studií (22, 24), ačkoliv zde nedosahoval vztah přítomnosti fibrózních tělísek a exprese prolaktinu statistické signifikance. Autor předpokládá, vzhledem k poznatkům o morfologii prolaktinomů a somatotropních

PitNETů, že přítomnost fibrózních tělísek v těchto nádorech odráží komponentu STH produkujících buněk (ačkoliv k potvrzení této hypotézy by bylo nutné doplnit současný imunohistochemický průkaz STH a cytokeratinu 18). Jelikož ve skupině SLT převládali muži (15:11) a v obecné rovině je chování prolaktinomů u mužů agresivnější, nelze v této podskupině vyloučit menší velikost nádorů při převaze STH-pozitivních buněk (s fibrózními tělísky). Jedná se však pouze o spekulaci z několika důvodů: 1) ne všechny STH<sup>+</sup> buňky v SLT musí obsahovat fibrózní tělíska a jejich přítomnost tedy nemusí nutně odrážet zastoupení jednotlivých buněčných subtypů, 2) v literatuře nebylo zaznamenáno odlišné biologické chování SLT skupiny u mužů a u žen (i když v recentní literatuře nebylo ani extenzivněji studováno), 3) na rozdíl od prolaktinomů u mužů, jež bývají často hormonálně nezávislé(213) je exprese estrogenového receptoru u somatotropních tumorů s koexpresí prolaktinu běžně přítomná bez ohledu na pohlaví(15, 214), 4) jakkoliv byl rozdíl v množství fibrózních tělísek statisticky signifikantní, samotný medián se lišil o pouhých 25 % oproti DGST a v případě prognostického významu se jednalo o korelační vztah, který nebyl zpětně ověřen regresním modelem a 5) jak bylo uvedeno výše, rozdíl mezi množstvím fibrózních tělísek se statisticky nelišil mezi skupinami malých a velkých tumorů v SLT podskupině. Je tedy možné, že popisovaná korelace mezi objemem tumoru a fibrózními tělísky je pouze výsledkem kubické amplifikace jednorozměrné proměnné (největší průměr) a neodráží existující biologický vztah. Samotná přítomnost fibrózních tělísek pak může být součástí biologického fenotypu SLT, jejíž význam v současné době nelze blíže identifikovat. Frekvence výskytu dalších nádorových podskupin se v našem souboru výrazněji neodlišovala od údajů uváděných v literatuře (viz tabulka 4.3), s výjimkou četnějšího zastoupení plurihormonálních tumorů; nelze vyloučit, že se v tomto případě jedná o následek benevolentněji nastavené definice této jednotky (viz sekce 8.3) a autor tomuto nálezu nepřikládá větší význam.

Po klinické stránce se histologické subtypy odlišovaly pouze mladším věkem pacientů s SGST oproti non-SGST ( $p=0,026$ ), přičemž bylo možné identifikovat statisticky nesignifikantní trend k větší velikosti SGST oproti non-SGST ( $p=0,07$ ). Tyto poznatky jsou v souladu s dostupnou literaturou a byly v detailu diskutovány v sekci 8.2. Nezaznamenali jsme rozdíly v invazivitě mezi jednotlivými subtypy tumorů, obdobně jako v jiných pracích(24, 26, 215), ačkoliv v některých studiích byla naopak pozorována častější invaze kavernózního sinu u SGST(22, 59), případně u tumorů s nízkou expresí E-cadherinu, což je fenotyp, jenž se charakteristicky vyskytuje u SGST (viz dále)(145). Mezi jednotlivými

subtypy nebyly pozorovány ani odlišnosti v sérových hladinách IGF1 a STH, též v souladu s literaturou (22, 24, 26, 62, 133, 215) a dále se nelišily hladiny TSH a prolaktinu. Samotná absence rozdílu v hladinách prolaktinu mezi jednotlivými podskupinami je poněkud překvapivá. V jedné z předchozích studií byla přítomná signifikantně nižší hladina prolaktinu ve skupině tumorů bez imunohistochemické exprese prolaktinu(26). Přestože se v naší práci jednotlivé skupiny signifikantně nelišily, odráží tento nález dle názoru autora definici jednotlivých kategorií tumorů: jediná skupina, jež prokazatelně neobsahovala (respektive obsahovala méně než 10 %) prolaktin imunoreaktivní buňky byly DGST, zatímco ve zbývajících skupinách bylo množství prolaktin-imunoreaktivních buněk variabilně zastoupeno, protože nebylo nijak zohledněno v definici SGST ani u plurihormonálního subtypu. Přítomnost vztahu mezi množstvím buněk s expresí prolaktinu a sérovou hladinou tohoto hormonu odráží pozitivní, statisticky signifikantní korelace mezi těmito parametry, jež byla nejvýrazněji zastoupena ve skupině SGST ( $p=0,497$ ,  $p=0,001$ ). Vlastní exprese prolaktinu v SGST může být neočekávaná, jedná se nicméně o popsany fenomén, ačkoliv tato koexprese bývá obvykle nižší ve srovnání s non-SGST podskupinou definovanou množstvím fibrózních tělísek(22, 24, 26, 68). S koexpresí prolaktinu se dále váže problematika exprese D2DR, neboť se jedná o receptor charakteristicky exprimovaný v prolaktinomech (viz sekce 4.7.6). Z literatury je patrné, že k expresi D2DR dochází též v somatotropních PitNETech (viz sekce 4.7.7), není vázána na koexpresi prolaktinu(140, 166) a lze ji identifikovat bez ohledu na množství fibrózních tělísek(167) – jedna práce dokonce ilustrovala pozitivní korelaci s expresí SSTR5, jež bývá častější právě u SGST(166). V naší práci bylo možné identifikovat expresi D2DR ve všech histologických podskupinách. Nejvyšší exprese byla přítomná ve skupině SLT a plurihormonálních tumorů, nález však nedosahoval statistické signifikance. Korelační analýzou jsme následně neprokázali vztah mezi množstvím buněk exprimujících prolaktin a expresí D2DR (viz sekce 7.3.4.5), v souladu s citovanými pracemi, a též jsme neprokázali vztah mezi expresí D2DR a sérovými hladinami prolaktinu. Patrná byla ovšem signifikantní negativní korelace ( $p=-0,28$ ) mezi expresí D2DR a sérovými hladinami IGF1, jež byla nejvíce vyjádřená ve skupinách SGST a SLT a naopak nebyla přítomná u DGST a plurihormonálních tumorů. Prognostický vztah D2DR byl dále akcentován v SLT skupině, kde byla patrná negativní korelace mezi expresí a velikostí tumoru ( $p=-0,48$ ) a tento nález byl potvrzen vyšší expresí D2DR v menších SLT ( $p=0,025$ ), nikoliv ale v jiných nádorových subtypech. Exprese D2DR byla dále signifikantně nižší ( $p=0,038$ ) ve skupině nádorů s invazí kavernózního sinu oproti nádorům neinvazivním a vzhledem k předchozím údajům nelze



vyloučit, že se na tomto nálezu podílel právě skupina SLT. Výše popsané nálezy jsou neobvyklé, neboť v dostupných pracích zabývajících se expresí D2DR v somatotropních tumorech nebyl pozorován jakýkoliv signifikantní vztah mezi sérovými hladinami STH, IGF1 ani prolaktinu(130, 132, 136). Vztah mezi expresí D2DR a invazivitou nebyl navíc v literatuře blíže studován. Interpretace je obtížná, neboť se z výše uvedeného nezdá, že by pozitivita D2DR korespondovala s množstvím buněk secernujících prolaktin a odrážela tak „nižší“ či „vyšší“ agresivitu jednotlivých buněčných subpopulací v tumoru, což je mimochodem fenomén, jenž v literatuře nebyl zaznamenán, jak bylo uvedeno výše, a nebyl zaznamenán ani v naší studii. Vzhledem k rozmezí průměrných hodnot H-skóre D2DR mezi malými a velkými SLT (59,05 u malých vs 30,30 u velkých) a mezi invazivními a neinvazivními tumory (46,67 u neinvazivních oproti 14,17 u invazivních) je ovšem otázkou, nakolik je tento rozdíl klinicky významný. K bližšímu ověření biologické relevance tohoto nálezů by bylo vhodné provést prospektivní studii, jež by tuto spojitost pomohla potvrdit.

Expres E-cadherinu v naší práci podpořila závěry opakovaných studií, jež pozorovaly signifikantně nižší expresi E-cadherinu v SGST subtypu (zevrubný přehled této problematiky viz 4.8.3.1). Expres E-cadherinu v celém souboru korelovala negativně s velikostí ( $p=-0,23$ ), tuto korelaci jsme však nezaznamenali v jednotlivých podskupinách tumorů a nález tedy dle autora odráží asociaci nízké exprese tohoto proteinu s SGST a s větším rozměrem tumorů v této podskupině (viz sekce 8.2). To je podpořeno dalšími dvěma nálezy: 1) nízká expres E-cadherinu byla nejcharakterističtější znakem SGST podskupiny (což je ilustrováno analýzou ROC křivek v 7.3.4.3), 2) při porovnání velkých a malých nádorů v jiných histologických podskupinách se tyto nádory expresí E-cadherinu signifikantně nelišily. Určitou výjimku představovala skupina plurihormonálních tumorů, kde byla sice patrná nižší expres u větších tumorů, ta ovšem dosáhla pouze hraniční statistické signifikance ( $p=0,051$ ). V naší práci jsme zaznamenali úplnou absenci exprese E-cadherinu u podskupiny klasifikované jako PPPT a nelze tak vyloučit, že některé nádory z plurihormonální podskupiny s nižší expresí E-cadherinu by byly jinými hodnotiteli klasifikovány jako PPPT. Nutné je poznamenat, že nádory námi definované skupiny plurihormonálních tumorů vykazovaly expresi E-cadherinu (nikoliv H-skóre) v 85–100 % buněk (pro srovnání, všechny tři PPPT v naší studii E-cadherin vůbec neexprimovaly). Výjimkou byl jediný plurihormonální tumor, kde bylo pozitivních pouze 35 % buněk Tento případ byl současně zajímavý redukcí exprese cytokeratinu 18, která byla patrná pouze v 50 % buněk. Kompletní ztrátu exprese E-cadherinu vykazoval jediný případ z non-SGST skupiny tumorů, jenž vykazoval morfologii charakteristickou pro DGST a

současně ztrátu exprese cytokeratinů (viz tabulka 7.15 a komentář v sekci 7.3.4.1). Ztráta exprese E-cadherinu v tomto kontextu tedy nejspíše nemusí nutně znamenat přímou asociaci s SGST/PPPT fenotypem, ale může jen ilustrovat ztrátu „epiteliálního fenotypu“. Přestože nízká exprese byla charakteristická pro SGST, vyskytly se v této skupině též ojedinělé případy s expresí srovnatelnou s tumory z non-SGST kategorie a naopak. V SGST skupině bylo přítomno pouze pět tumorů s H-skóre E-cadherinu  $>50$  a jen 3 tumory s H-skóre vyšším než 100, přičemž nejvyšší H-skóre v této podskupině bylo 160. Ve všech těchto pěti případech se množství fibrózních tělísek pohybovalo mezi 75–85 %, tedy na hranici definice této jednotky. Ve skupině non-SGST se vyskytlo celkem 7 tumorů s H-skóre  $<100$ , zahrnující dva případy s redukovanou expresí cytokeratinů; medián velikost těchto případů byl 20 mm ve srovnání s 18 mm u ostatních non-SGST tumorů, rozdíl však byl nesignifikantní a obě skupiny se v dodatečné analýze signifikantně nelišily ani v žádném z dalších klinických parametrů. Oproti některým studiím (145, 146, 185, 193) jsme nepozorovali statisticky signifikantní asociaci mezi invazivitou a nižší expresí E-cadherinu, ačkoliv medián H-skóre E-cadherinu byl ve skupině invazivních tumorů nižší. Paušálně lze tedy říci, že nádory s nízkou expresí E-cadherinu bývají častěji větší a obvykle přísluší do podskupiny SGST, přičemž pravděpodobnost příslušnosti k SGST subtypu je nepřímě úměrná kvantitě exprese. Vztah snížené exprese E-cadherinu, většího objemu tumorů a častější invazivity byl opakovaně demonstrován v různých studiích zabývajících se somatotrofními PitNETy (viz sekce 4.8.3.1); jeho příčinou je nejspíše komplexní proces epitelomesenchymální tranzice (EMT), k němuž v části somatotrofních PitNETů s nízkou expresí E-cadherinu dochází (186, 216). V kontextu EMT vede pokles exprese E-cadherinu k snížené buněčné kohezi a umožňuje buněčnou migraci a invazivitu, což jsou mimo jiné jedny z hlavních znaků procesu. Přesná příčina útlumu exprese E-cadherinu byla popsána jen u menší části SGST a docházelo k ní na podkladě metylace genu *CDH1* (187). Proč je nízká exprese E-cadherinu tak těsně spojena s SGST fenotypem je nejasná, obdobně, jako dosud nebyla přesně objasněna etiologie vzniku SGST a fenotypová dichotomie mezi SGST a non-SGST, patrná v naprosté většině dostupných studií stran klinických parametrů (viz sekce 4.5.3.5) a exprese SSTR (viz sekce 4.6.7). V naší studii jsme pro stanovení E-cadherinu používali protilátku proti extracelulární doméně proteinu a pozorovali jsme pouze membránový typ exprese. Toto pozorování působí banálně, ovšem metodika analýzy exprese E-cadherinu protilátkami proti intracelulární a extracelulární doméně zasluhuje hlubší komentář z důvodů klinických implikací výsledků minimálně u dvou studií (146, 185). Existuje několik klonů protilátek rutinně používaných pro stanovení E-cadherinu: některé z klonů detekují epitopy lokalizované v extracelulárních

částech molekuly, zatímco jiné detekují epitopy z oblasti intracelulární domény. Protilátky proti extracelulárním oblastem vykazují membránovou pozitivitu. Protilátky detekující intracelulární doménu vykazovaly v několika studiích opakovaně jadernou lokalizaci pozitivní reakce (192, 217, 218). Tento nález byl patrný v různých typech tumorů, jako je např. solidní pseudopapilární tumor pankreatu, neuroendokrinní tumory pankreatu, karcinom z Merkelových buněk, dlaždicobuněčný karcinom jícnu a lobulární karcinom prsu (185, 217, 218). Biologickým podkladem tohoto fenoménu je patrně jaderná translokace E-cadherinového fragmentu po digesci  $\gamma$ -sekretázou (190, 191) (viz sekce 4.8.1.3), přičemž samotný účinek jaderné translokace není zcela objasněn. Vazba fragmentu E-cad/CTF2 v některých studiích zvyšovala jadernou aktivitu p120 proteinu (182), v některých odpovídala jaderné kolokalizaci s  $\beta$ -cateninem a v jiné studii naopak inhibovala aktivitu WNT/ $\beta$ -cateninové signalizace (192). Prokazatelná jaderná translokace  $\beta$ -cateninu ani p120 ovšem nebyla v somatotropních PitNETech zaznamenána (viz sekce 4.8). Přítomnost jaderné positivity E-cadherinu u 17 % somatotropních tumorů (15/88 případů) měla prognostický a prediktivní význam (viz sekce 4.8.3) (146, 185), odlišný od membránové exprese, mechanismus tohoto efektu vzhledem k výše uvedeným údajům nejspíše neodvisí od intranukleární interakce s p120 proteinem či  $\beta$ -cateninem; hlubší diskuze a analýza problematiky je nad rámec této práce. Je nutné uvést, že obě studie, které zaznamenaly jadernou pozitivitu E-cadherinu, užívaly k detekci klon 36 (146, 185). Tentýž klon nicméně používaly k detekci také jiné studie, které jadernou pozitivitu nezaznamenaly (145, 187, 188). Současně byl přítomen výrazný rozdíl mezi množstvím E-cadherin negativních případů: zatímco v části studií (146, 185) byla exprese E-cadherinu přítomná v podstatě ve všech tumorech (v souladu s údaji z RT-qPCR, viz 4.8.3.3), podíl negativních případů v ostatních studiích značně kolísal (např. až 51 % v (145)), přičemž výsledky těchto studií stran množství pozitivních případů byly v podstatě srovnatelné s výsledky studií využívajících protilátku proti extracelulární doméně. Dle názoru autora (na podkladě osobní zkušenosti s imunohistochemickou metodikou) reflektují tyto rozdíly nejspíše odlišnost jednotlivých laboratorních postupů („pretreatment tkání“, doba inkubace a koncentrace protilátek) v jednotlivých studiích. Výše uvedené údaje současně poukazují na metodicky obtížně reprodukovatelnou detekci jaderné lokalizace E-cadherinu a tím pádem také na její spornou prognostickou a prediktivní (viz 4.8.3.5) využitelnost v rutinní praxi. Ačkoliv nelze zcela vyloučit, že se v těchto konkrétních případech jednalo o artefakt spojený s použitou

protilátkou, dle autora je tato možnost vzhledem k dobře popsané existenci tohoto biologického fenoménu spíše méně pravděpodobná.

Expresí SSTR se v našem souboru nejvíce lišila mezi skupinou SGST a non-SGST tumorů, jak ilustruje tabulka 7.16. Expresí SSTR1 byla signifikantně vyšší v non-SGST podskupině, v analýze zahrnující všechny 4 subtypy však tento rozdíl neměl signifikantní charakter. Expresí SSTR1 nefigurovala jakožto statisticky signifikantní parametr ve většině dalších analýz, což vzhledem k obecně nízké expresi tohoto receptoru v somatotropních PitNETech (viz 4.6.7.2 a dále např. (114)) není zcela překvapivé. Expresí SSTR1 vykazovala hraniční trend ( $p=0,051$ ) pro vyšší expresi u neinvazivních tumorů, rozdíl ale představoval pouhé 2 body H-skóre a reálný význam tohoto nálezu je tedy zanedbatelný. Jediný signifikantní vztah zahrnující SSTR1 byla relativně výrazná ( $p=-0,86$ ) negativní korelace se sérovou hladinou TSH zaznamenaná ve skupině plurihormonálních tumorů. H-skóre pro SSTR1 se v této skupině tumorů pohybovalo v rozmezí 0-3,3, s ojedinělou odlehlou hodnotou 21,6. Hladina TSH se též pohybovala v normálním rozmezí a je tedy otázkou, nakolik se jedná o biologicky relevantní nález. Tento poznatek ale může ilustrovat hlubší, dosud nepopsaný patofyziologický jev. SSTR1 je po SSTR4 receptor s nejnižší afinitou k SSA první i druhé generace (viz tabulka 4.6) a z těchto důvodů nebyly jím aktivované signalizační dráhy extenzivněji studovány, ve srovnání např. se SSTR2A anebo SSTR5. SSTR1 byl v jedné ze studií druhým nejčastěji exprimovaným receptorem po SSTR2A ve skupině tyreotropních tumorů(219). Tyto tumory jsou velmi vzácné a funkce jednotlivých SSTR byla v jejich kontextu studována pouze omezeně, s důrazem na SSTR2A a SSTR5(91). Nelze tedy vyloučit funkční přítomnost SSTR1 v podskupině tyreotropně diferencovaných buněk tumoru, jež by mohla např. prostřednictvím endogenního somatostatinu inhibovat sekreci TSH. Jedná se ovšem pouze o spekulativní vysvětlení, které by vyžadovalo další experimentální ověření. Expresí SSTR2A v naší studii odpovídala poznatkům z předchozích prací, které opakovaně ilustrovaly signifikantně nižší expresi tohoto receptoru v podskupině SGST (viz tabulka 4.8). Skóre SSTR2A bylo dále nižší u žen ve srovnání s muži, signifikance ale byla hraniční ( $p=0,049$ ) a mediány obou skupin se lišily o jen 22 bodů. Vysvětlením může být častější výskyt SGST u žen (48 %) ve srovnání s muži (34 %), jenž sám o sobě nedosáhl statistické významnosti. Obdobné vysvětlení (asociace nízké exprese s SGST) má též dle názoru autora negativní korelace mezi velikostí nádorů a expresí tohoto receptoru. Ve vlastní skupině SGST byla přítomná negativní korelace mezi expresí SSTR2A a sérovou hladinou TSH ( $r=-0,47$ ), přičemž tento nález přetrvával i po dodatečném odstranění  $\beta$ TSH imunoreaktivních tumorů

z analýzy ( $p=-0,56$ ,  $p=0,002$ ). Vysvětlením tohoto jevu tedy nejspíše není interakce mezi SSTR2A a sekrecí TSH (pro což svědčí i absence obdobného korelačního vztahu ve skupině plurihormonálních tumorů). Jako vysvětlení se může nabízet hypotéza, že v tomto kontextu nízká hladina odpovídá hypopituitarismu způsobenému velikostí nádoru. Proti této možnosti mluví absence statisticky signifikantního vztahu mezi velikostí a expresí SSTR2A u SGST v provedených analýzách. Nelze vyloučit ani komplexnější endokrinologické regulační mechanismy související s hladinami ostatních hormonů, i v tomto případě platí nicméně fakt, že se jednalo o laboratorní nález diskrétního charakteru, který neměl klinický korelát (viz sekce 8.1). Exprese SSTR2A se odlišovala mezi SGST a podskupinami DGST a SLT, nikoliv však u skupiny plurihormonálních tumorů. Zatímco obdobná exprese SSTR2A mezi DGST a SLT podskupinou byla v literatuře popsána(81) a samotná koexprese prolaktinu neměla na hladinu SSTR2A vliv ani v jiné práci(125), nikdo se dosud blíže nezabýval expresí SSTR2A v podskupině somatotropních PitNETů s koexpresí  $\beta$ TSH. I v tomto případě byla nicméně exprese SSTR2A v SGST nižší a rozdíl mezi mediány obou podskupin představoval 65 bodů. Zajímavým nálezem v kontextu několika dalších prací zabývajících se touto tematikou je exprese SSTR2A ve skupině pacientů s předchozí neoadjuvantní léčbou SSA. Jednalo se celkem o 9 případů, a ačkoliv byl vzorek tímto počtem pacientů limitován, nepodařilo se nám prokázat signifikantní rozdíl mezi expresí SSTR2A v obou skupinách. Případy s neoadjuvantní terapií vykazovaly nižší expresi SSTR2A ( $p=0,07$ ), což mohlo být částečně způsobeno přítomností celkem 5 SGST. Signifikantní rozdíl v expresi jsme ovšem nezaznamenali, ani když jsme porovnali pouze non-SGST tumory v obou skupinách (ačkoliv tento postup je zatížen určitou statistickou limitací z důvodu malého množství pacientů). Dle dostupných dat se zdá, že předchozí aplikace SSA může vést k poklesu exprese SSTR2A a ke vzniku terapeutické resistance u části tumorů. Dvě práce přímo popsaly signifikantní pokles exprese SSTR2A u tumorů po léčbě SSA ve srovnání s neléčenými případy (114, 134). Redukce exprese mRNA SSTR2A v tumorech po léčbě SSA však nebyla zaznamenána v jiných dvou studiích(130, 131). V (134) nebylo možné vyloučit selekční ovlivnění studie, neboť většina předléčených tumorů byly ve srovnání s neléčenou skupinou makroadenomy a studie nerozlišovala histologický subtyp (exprese SSTR2A bývá nižší u SGST a ty naopak bývají větší ve srovnání s DGST). Oproti tomu byla sice druhá studie (114) randomizovaná a předléčené tumory nevykazovaly signifikantně odlišný objem, opět ale nebyl zohledněn histologický subtyp tumorů. Provedený in vitro experiment na 8 primárních buněčných kulturách somatotropních tumorů neprokázal redukci exprese mRNA SSTR2A po protražované aplikaci SSA, z čehož autoři usuzovali, že hlavní roli v poklesu

imunohistochemicky detekovatelné exprese SSTR2A hraje spíše internalizace receptoru nežli transkripční down-regulace(114). To by tak představovalo vysvětlení pro srovnatelné hladiny mRNA v tumorech před léčbou a po léčbě SSA v jiných studiích(130, 131). Údaje o poklesu exprese SSTR2A měřené western-blotem v jiné práci (149) tuto možnost též nevylučují, neboť množství proteinu v buňce není determinováno pouze expresí mRNA, ale též rozsahem degradace, k níž v případě membránových proteinů dochází právě po internalizaci do endosomálního kompartmentu buňky. V případě internalizace receptoru by bylo možné očekávat cytoplasmatickou pozitivitu imunohistochemické reakce; tu jsme ovšem nezaznamenali ani v jednom ze studovaných tumorů, obdobně jako autoři výše citované studie(114), kteří použili stejnou monoklonální protilátku (UMB-1). Vysvětlením je nejspíše změna antigenicity receptoru po internalizaci, neboť cytoplasmatická pozitivita při použití UMB1 nebyla zaznamenána ani v jiných studiích(125, 126), ačkoliv internalizovaný SSTR2A po vazbě SSA lze prokázat v buňkách jinými metodami(220). V kontextu výše uvedeného se nabízí několik vysvětlení, proč se v naší studii hladiny SSTR2A nelišily mezi neoadjuvantně léčenými a primárně operovanými tumory. Jednak je nutné poznamenat, že ani jedna z prací ilustrujících pokles SSTR2A v somatotropních PitNETech po předchozí léčbě nevzala do úvahy histologický subtyp tumorů. Druhou, pravděpodobnější možností je časový odstup mezi podáním poslední dávky SSA a operací, kdy medián tohoto intervalu v naší studii představoval 1 měsíc. To je přibližně doba uvolňování dlouho účinkujících forem Oktreotid LAR a Lanreotid Autogel používaných v terapii. Je tedy otázkou, nakolik se v našem souboru promítla délka aplikace SSA respektive odstup mezi SSA a operací. Problematika kinetiky SSTR2A in vivo a in vitro v kontextu léčby SSA navíc není v literatuře zcela objasněna stran délky trvání endosomální redistribuce SSTR2A(220). Vzhledem k absenci změn v hladinách mRNA po léčbě lze nejspíše předpokládat rekonstituci membránové exprese v určitém časovém odstupu. Tento závěr navíc podporuje studie provedené odlišnou protilátkou, ve které lokalizace SSTR2A (membránová vs cytoplasmatická) nehrála roli ve výsledné léčebné odpovědi, ve srovnání se samotnou kvantitou exprese(136). Nutné je dále dodat, že pravděpodobnost samotné internalizace a další recyklace receptoru může být výrazně ovlivněna tvorbou heterodimerů s jinými SSTR (viz sekce 4.6.5). Změny v hladinách jiných SSTR po aplikaci SSA nebyly zaznamenány(114, 134), a nepozorovali jsme je ani v naší studii. Exprese SSTR3 se napříč histologickými subtypy lišila a obdobně jako u SSTR2A byla nejnižší v SGST podskupině a nejvyšší u DGST. Plurihormonální tumory a SLT se statisticky nelišily od obou skupin a exprese SSTR3 byla v non-SGST signifikantně vyšší ve srovnání s SGST. Ve srovnání s literaturou (61, 133, 148) jsme tedy pozorovali odlišnosti v expresi

SSTR3 mezi jednotlivými subtypy. Příčinou této odlišnosti je nejspíše mnohem citlivější metodika H-skóre použitá v naší studii, neboť ostatní zmíněné práce využívaly 2- až 4-stupňové hodnotící škály. Tento postup je vhodný z důvodu vyššího a lépe reprodukovatelného klinického významu histologického nálezu (rozdíl mezi skóre 2 a 3 reprezentujícím pozitivitu v <50 % a >50 % buněk je jistě po praktické stránce lépe uchopitelný, nežli rozdíl ve 20 bodech H-skóre), je ovšem pravděpodobné, že část skutečných biologických nálezů nebude v těchto jednoduchých škálovacích systémech zohledněna. Samotná exprese SSTR3 korelovala ve skupině plurihormonálních tumorů pozitivně s hladinami STH, přičemž ve skupině SLT byl naopak přítomen negativní vztah mezi oběma veličinami, jenž nedosáhl statistické významnosti ( $p=0,051$ ). Příčinou tohoto nálezu při vizuální inspekci dat nebyly případné odlehle hodnoty, ale jednalo se o doopravdy existující trend v obou nádorových skupinách. Ve skupině plurihormonálních tumorů jsme si povšimli klesajícího množství prolaktin a  $\beta$ TSH imunoreaktivních buněk, spolu se stoupající sérovou hladinou STH a expresí SSTR3. Dodatečně jsme tedy provedli korelační analýzu ve všech podskupinách, abychom prozkoumali vztah mezi expresí SSTR3, hladinou STH a množstvím buněk negativních v průkazu prolaktinu a  $\beta$ TSH. V této analýze jsme nezaznamenali signifikantní korelační vztah pro celý soubor, SGST, non-SGST, DGST a SLT. Překvapivě byla přítomná pozitivní korelace v podskupině plurihormonálních tumorů kdy množství  $\beta$ TSH/prolaktin<sup>+</sup> buněk pozitivně korelovalo s expresí SSTR3 ( $\rho=0,66$ ,  $p=0,03$ ), přičemž korelace s hladinami STH měla charakter trendu, avšak nedosáhla statistické signifikance ( $\rho=0,588$ ,  $p=0,07$ ). Z výše uvedeného se tedy zdá, že SSTR3 je ve skupině plurihormonálních tumorů exprimován preferenčně na podskupině buněk syntetizujících pouze STH. Tuto hypotézu by bylo nutné ověřit např. pomocí dvojité imunohistochemie. Absence korelačního vztahu v kontextu této hypotézy není překvapivá ve skupině SGST, kde bývá imunoreaktivita STH přítomná na velmi variabilní frakci buněk, ani ve skupině DGST, kde je STH exprimováno naprostou většinou buněk. Tyto dvě skupiny vykazovaly v naší práci též nejnižší, respektive nejvyšší expresi SSTR3. Příčina absence tohoto vztahu není zřejmá v SLT skupině. Zde jsme však pozorovali další neobvyklý nález sdružený s expresí SSTR3: obdobně jak v případě D2DR, exprimovaly menší SLT SSTR3 častěji ve srovnání s většími tumory (rozdíl průměrů H-skóre 46,  $p=0,03$ ). Je tedy otázkou, ilustruje-li vyšší exprese SSTR3, obdobně jako častější přítomnost fibrózních tělísek, též častější zastoupení podskupiny buněk bez produkce prolaktinu a jejich asociaci s lepší prognózou, jak již bylo zmíněno v části diskuse zabývající se fibrózními tělísky. Další možnost, která nebyla v této souvislosti dosud

uvedena, vyplývá z klasifikačního schématu použitého v této práci, který nerozlišoval podskupiny mammosomatotropních a smíšených somatotropních-laktotropních tumorů. Rozlišení těchto dvou skupin je orientačně možné na podkladě morfologického nálezu(12), přičemž nejspolehlivější metodou je pro tyto účely elektronová mikroskopie(12, 15). Ačkoliv se někdy uvádí, že somatotropní-laktotropní tumory častěji exprimují estrogenový receptor(15), jiné prameny včetně WHO klasifikace popisují expresi estrogenového receptoru v obou subtypech(3, 12) a průkaz estrogenového receptoru tedy neumožňuje spolehlivé odlišení obou těchto jednotek. Existují sice údaje o agresivnějším chování smíšených somatotropních-laktotropních nádorů(221, 222), většina dostupných literárních pramenů včetně WHO klasifikace se o odlišné prognóze těchto tumorů nezmiňuje(3, 12, 15). Z výše uvedených důvodů jsme se tedy rozhodli tyto podskupiny neodlišovat, obdobně jako většina dalších novějších publikací zabývajících se patologií somatotropních tumorů(22, 24, 26). Vzhledem k tomu, že v novější literatuře neexistují přesné údaje o prognostickém významu ani o profilu exprese SSTR a D2DR u těchto dvou patologických subtypů, nelze vyloučit, že naše nálezy v kategorii SLT, ať už stran množství fibrózních tělísek, D2DR anebo SSTR3 ilustrují tuto dichotomii. Potvrzení této hypotézy by ovšem vyžadovalo další experimentální ověření. Posledním analyzovaným receptorem byl SSTR5, jehož exprese byla ve skupině SGST signifikantně vyšší v porovnání s non-SGST. Z vlastních podskupin non-SGST byla exprese signifikantně nižší u SLT, zatímco DGST a plurihormonální tumory se od SGST nelišily. Tento nález je v souladu s většinou dostupných pramenů (viz sekce 4.6.7 a tabulka 4.10), kde byla opakovaně prokázána vyšší exprese v SGST podskupině, ačkoliv ne vždy byl rozdíl signifikantní. V některých studiích byla exprese signifikantně vyšší též oproti DGST (61, 133), jednalo se ale o výsledky RT-qPCR, jež následně buďto nekorespondovaly s imunohistochemickým stanovením(133), anebo korespondovaly, avšak byly provedeny méně spolehlivými protilátkami(61), ve srovnání s klonem UMB4 použitým v této studii(125, 126). Rozdíl mezi imunohistochemickými metodami ilustruje např. též fakt, že zatímco ve výše citované práci (61) nebyla exprese SSTR5 zaznamenána ani v jednom z DGST (i přes přítomnost mRNA tohoto proteinu), v práci analyzující celkem 32 DGST byla exprese přítomná v průměru v 53 % nádorových buněk(125). V dalších analýzách jsme následně neprokázali statisticky signifikantní asociaci mezi SSTR5 a dalšími, ať už klinickými anebo patologickými parametry souboru.

Pokud bychom měli shrnout poznatky uvedené v této části práce, lze říci, že na podkladě imunohistochemického profilu se jako nejodlišnější skupina tumorů jeví SGST definované



pomocí množství fibrózních tělísek. Zatímco tato dichotomie přetrvávala u většiny vyšetřených parametrů mezi SGST a DGST (E-cadherin, SSTR2A, SSTR3) a SLT (E-cadherin, SSTR2A, SSTR5), nejvíce podobný imunohistochemický profil vykazovala skupina plurihormonálních tumorů, která se od SGST lišila v podstatě pouze expresí E-cadherinu. Je samozřejmě otázkou, nakolik lze expresi několika specifických proteinů z úzce vybrané funkční podskupiny považovat za charakteristický či dokonce definující rys jednotlivých nádorových subtypů, zajímavé ovšem je, že náš náleznepřímokoresponduje s již zmiňovanou prací, která poukázala na příbuznosti podskupin SGST, PPPT a thyreotropních nádorů(211).

### **8.5 Význam exprese AIP, Ki67, p53, mitotické aktivity a grade dle Trouillas**

Expres Ki67, p53 a mitotická aktivita jsou nejčastěji studované biologické faktory s potenciálním prognostickým významem. V této práci jsme se dále zaměřili na grade definovaný systémem J. Trouillas, jehož použití je v současné době doporučováno(1). Tento systém zohledňuje všechny tři výše uvedené parametry a dále zohledňuje invazi sinus cavernosus. Neboť údaje o invazi nebyly dostupné pro část našeho souboru, rozhodli jsme se analyzovat separátně obě části systému (tedy patologické i radiologické). Ve výše citované práci hrála právě invaze (definovaná stupněm 3 a 4 Knospovy klasifikace) zásadnější roli ve srovnání s proliferační aktivitou – zatímco OR pro přítomnost onemocnění na konci follow-up mezi skupinou invazivních a neinvazivních tumorů bylo 6,59, u proliferujících a neproliferujících tumorů představovalo OR pouhých 2,89; tedy méně než OR mezi mikrotumory a makrotumory (3,2). Výraznou limitací ve zhodnocení prognostického významu studovaných veličin je v tomto ohledu absence údajů o radiologickém follow-up nádorů v registru, včetně údajů z pooperačních zobrazovacích vyšetření, což dále znemožňuje bližší a spolehlivější hodnocení významu studovaných parametrů. Z těchto důvodů má naše práce pouze charakter jednorázového časového průřezu v době primární operace tumoru. To nám zabraňuje přesněji hodnotit prognostický význam těchto parametrů v čase a omezuje tak výpovědní hodnotu naší práce. Relativně malým omezením je absence dostatečného množství histologického materiálu v některých případech, jež by umožnilo spolehlivě zhodnotit 10 HPF nutných pro spočítání mitotické aktivity anebo pozitivitu p53 – ta byla pro účely naší studie definována totožně, jako ve výše citované práci(1). Tento faktor byl komentován ve výsledkové části, obdobně jako změny související s předchozí léčbou SSA. Ty se týkaly indexu Ki67, jenž byl signifikantně nižší u předléčených tumorů ( $p=0,02$ ). Nález je v souladu s literárními poznatky, jež v tumorech po léčbě SSA identifikovaly sníženou proliferační aktivitu, nikoliv však zvýšenou frekvenci apoptóz(64). Pokles proliferační

aktivity se odrazil nejspíše též v nižší frekvenci p53 positivity, ta ovšem nedosáhla statistické signifikance ( $p=0,09$ ). Z těchto důvodů jsme v dalších analýzách zahrnujících Ki67 vyřadili pacienty předléčené SSA a též jsme je vyřadili z analýz posuzujících proliferativitu dle Trouillas. Nevyřadili jsme je ovšem z analýz zabývajících se expresí p53. U části předléčených pacientů (5/9) jsme pozorovali morfologické změny v tumorech v podobě perivaskulární hyalinizace stromatu. Tento obraz může přímo souviset s léčbou, vyskytuje se nicméně též nezávisle na farmakoterapii a tento nálezn je opět v souladu s literaturou(223). Samotný Ki67 index se v naší studii signifikantně nelišil mezi podskupinami tumorů v jednotlivých analýzách; tento nálezn je poněkud neočekávaný, především ve vztahu k velikosti nádorů a k invazivitě. Obdobná absence vztahu indexu Ki67 k velikosti tumorů(25, 74, 79), invazivitě(25), biochemickému profilu jednotlivých případů (25, 79) i histologickému subtypu (24) byla v minulosti zaznamenána, ačkoliv existuje též práce, kde byl index Ki67 signifikantně vyšší v SGST podskupině(59, 148). Jediný parametr v naší studii, jenž signifikantně souvisel s expresí Ki67 byla hladina STH v korelační analýze. Pozitivní souvislost obou veličin byla přítomná jak v SGST podskupině ( $\rho=0,35$ ), tak především u non-SGST tumorů ( $\rho=0,34$ ,  $p=0,008$ ). Tento nálezn však v jiných studiích zaznamenán nebyl(77, 79). Tento fenomén dle našeho názoru nelze vysvětlit větším objemem těchto tumorů, neboť jsme nezaznamenali korelaci s velikostí ani rozdíly v expresi Ki67 mezi velkými a malými tumory. Hypoteticky by tento vztah mohl ilustrovat podskupinu tumorů, v nichž je proliferační aktivita spojená přímo se sekreční aktivitou nějakým patogenetickým mechanismem, např. přítomností *gsp*. Proti vlivu přítomnosti tumorů s *gsp* ovšem svědčí absence asociace této mutace s vyšším indexem Ki67 (24, 59), ačkoliv asociace *gsp* s vyššími hladinami STH byla v některých pracích zaznamenána(24). Též je třeba poznamenat, že frakce Ki67 pozitivních buněk byla ve většině případů velmi nízká (v průměru 3,08 % v hot spotech) a je tedy nepravděpodobné, že by se tato buněčná populace přímo podílela na vyšších hladinách STH. Je také potřeba zvážít, že tento nálezn může spíše než vyšší produkci STH ilustrovat odlišný sekreční profil nádorů s proliferační aktivitou, neboť sekrece STH je u somatotropních PitNETů periodická a hladiny STH neodráží z těchto důvodů spolehlivě celkovou sekreční aktivitu tumorů. Asociace Ki67 se sérovou hladinou STH v korelační analýze má ovšem ještě další aspekt, jenž tuto hypotézu dále podporuje. Proliferující nádory (Trouillas B) se v naší studii též vyznačovaly signifikantně vyššími hladinami STH ( $p=0,007$ ) a současně signifikantně mladším věkem pacientů ve srovnání s neproliferujícími případy ( $p<0,001$ ). Většinu proliferujících případů dále tvořili muži (58 %) a samotný index Ki67 byl u mužů vyšší a exprese p53 častější (ačkoliv nesignifikantně). Proliferující tumory dále

vykazovaly trend k nižší expresi E-cadherinu ( $p=0,09$ ), což by hovořilo pro vyšší zastoupení SGST subtypu, jenž se naopak signifikantně častěji vyskytoval u mladších pacientů a byl pozitivní v průkazu p53. Vlastní zastoupení proliferačních kategorií nicméně nejevilo signifikantní asociaci s SGST subtypem. Kompletní grade dle Trouillas se v naší studii podařilo stanovit celkem u 70 tumorů, přičemž autorovi není známa jiná literární práce, jež by porovnávala klinickopatologické charakteristiky tumorů jednotlivých grade v tomto rozsahu. Ze všech analyzovaných parametrů se pacienti s nejagresivnější skupinou tumorů (2b) v naší práci vyznačovali signifikantně nižším věkem, větší velikostí nádorů a nižší expresí SSTR2A. Na podkladě těchto údajů lze usoudit, že existuje podskupina mladších pacientů s akromegalií, s vyššími hodnotami STH, vyšší proliferační aktivitou a častějším, avšak ne výhradním zastoupením SGST. Obdobné údaje o asociaci nižšího věku a agresivnějšího, invazivního fenotypu onemocnění s vyšším indexem Ki67 byly publikovány, nezaznamenaly ale častější asociaci s pohlavím anebo signifikantně vyšší hladiny STH(23). Přítomnost této fenotypické signatury v našem souboru může poukazovat na odlišnou patogenezi somatotropních PitNETů v závislosti na věku. Takovýto nálezn není ostatně v nádorové biologii neobvyklý. Neboť několik extenzivních genetických studií nebylo s to identifikovat v somatotropních PitNETech s výjimkou různých chromozomálních aberací častější přítomnost rekurentních mutací v jednotlivých genech(52, 53), je vhodné v tomto kontextu vzít do úvahy dvě nejčastěji se vyskytující patogenetické změny: přítomnost *gsp* a mutaci *AIP* genu. *Gsp* bývá častější u starších pacientů (24, 59, 199), není vázána na histologický subtyp(24, 59, 62) a *gsp*<sup>+</sup> tumory vykazují vyšší produkci STH(24), ačkoliv tento nálezn není pravidlem(59, 199). Zatímco některé práce uvádí menší velikost těchto tumorů(24), jiné rozdíl ve velikosti nezaznamenaly(59, 199) a obdobně protichůdné jsou výsledky stran indexu Ki67(24, 59, 199). V naší studii jsme detekci přítomnosti *gsp* neprováděli a nemůžeme se tedy vyjádřit k těmto výsledkům na základě našich zkušeností. Autor nicméně z výše uvedeného předpokládá, že se tato genetická změna týká spíše skupiny starších pacientů. Mutace v *AIP* je sice asociována s mladšími pacienty, ale v populaci somatotropních tumorů je poměrně raritní: ve skupině 55 tumorů s vysokou klinickou suspekci neidentifikovalo genetické testování ani jednoho nositele mutace *AIP*(201), obdobně další studie zahrnující 40 sporadických somatotropinomů též neidentifikovala ani jednoho pacienta se zárodečnou mutací(199) a další studie pak identifikovala 2 případy ve skupině 94 pacientů(202). Samotná exprese *AIP* však na tomto místě vyžaduje hlubší pozastavení. Exprese *AIP* ve sporadických tumorech kolísá(148, 199, 201, 202), přičemž přesný důvod není v současné době znám, ale nejspíše se na něm podílí diferenciální exprese miRNA(200). Nízká exprese *AIP* korelovala

signifikantně s vyšším indexem Ki67, invazivitou, větší velikostí tumorů a vyšší hladinou STH, přičemž tito pacienti byli častěji mladšího věku, asociace s věkem nicméně nebyla signifikantní(199). Obdobnou asociaci mezi nízkou expresí AIP a větším rozměrem tumoru, nikoliv však biochemickými parametry nebo Ki67 potvrdila i další práce, jež navíc identifikovala signifikantně nižší expresi AIP u SGST podskupiny (201). Jiná studie naopak nepozorovala asociaci mezi AIP a věkem, velikostí, invazivitou, biochemickými parametry a indexem Ki67(148). Je tedy možné, že podskupina mladších pacientů s vyšší proliferací aktivitou a vyšší hladinou STH odpovídá tumorům s nízkou expresí AIP. Ačkoliv jsme v našem souboru imunohistochemickou analýzu exprese AIP prováděli, vyšetřovali jsme pouze podskupinu pacientů zahrnutých do části studie analyzující odpověď na SSA. V tomto omezeném vzorku se exprese AIP nelišila mezi SGST a non-SGST a ani mezi malými a velkými tumory. Též jsme nepozorovali ani další signifikantní rozdíly v expresi tohoto proteinu napříč jednotlivými analyzovanými podskupinami, ačkoliv byl např. přítomen trend k nižší expresi u proliferující podskupiny tumorů ( $p=0,1$ ). Identifikovali jsme pouze negativní korelaci mezi expresí AIP a hladinou prolaktinu ( $p=-0,39$ ,  $p=0,03$ ), což je nález, jenž v kontextu současného poznání není autor schopen spolehlivě interpretovat. Jako možná příčina absence silnější asociace mezi expresí AIP a klinickopatologickým fenotypem v naší studii se autorovi jeví dvě možnosti: 1) exprese AIP byla posuzována pouze ve skupině nádorů, u kterých bylo následně možné hodnotit léčebnou odpověď na SSA. To samo o sobě představuje selekční bias, neboť se jednalo o tumory, které takovouto léčbu vyžadovaly – tedy z různých důvodů nevléčitelné pouze operativním zákrokem, a tedy nejspíše klinicky agresivnější ve srovnání se zbytkem kohorty. 2) Vlastní imunohistochemický průkaz AIP je z autorovy zkušenosti poměrně obtížná záležitost, neboť se jedná o protilátku, jež i ve vysokém naředění (v našem případě 1:2500) produkuje poměrně konstantní, velmi silnou imunohistochemickou reakci, ačkoliv určitého stupně diferencované exprese bylo v našem případě dosaženo v kontrolní tkáni – varleti. Odhlédneme-li od principiálních problémů s kvantitativní analýzou prostřednictvím amplifikované imunohistochemické reakce (touto problematikou se blíže zabývá např. (224)), představuje podle nás samotná interpretace pozitivitu největší problém této protilátky, jež byla mimochodem použita ve všech zmiňovaných studiích (klon 35-2). Tento fakt ilustruje skutečnost, že jsme ve skupině 31 vyšetřených tumorů neidentifikovali ani jeden negativní případ a průměrné H-skóre bylo 234,52 bodů. Obdobná byla nejspíše zkušenost autorů jiné práce, kde se průměrné H-skóre ve skupině pacientů s odpovědí na SSA a bez odpovědi lišilo jen o 50 bodů (220 vs 270)(202). Další tři studie byly schopny vyladit imunohistochemickou reakci k nižší senzitivě i přes

použití koncentrovanějšího antiséra (1:500 v (199, 201) a 1:1500 v (148)) a tyto práce tedy identifikují též tumory se slabou expresí AIP (ačkoliv v (201) se na množství těchto nádorů dozajista podílí i způsob semikvantitativního hodnocení exprese). Dle autora však výše uvedené ilustruje metodickou limitaci imunohistochemické detekce AIP, která se může sama o sobě podílet na rozdílných výsledcích různých studií i v budoucnu. *AIP* je ubikvitně exprimovaný gen a je tedy poměrně obtížné nastavit metodiku odpovídajícím způsobem, přičemž literatura v tomto ohledu neposkytuje další vodítka ke kalibraci reakce tak, aby odpovídala tomuto účelu (negativní kontrolu v podobě vynechání primární protilátky samozřejmě nepočítáme).

Jak bylo zmíněno v sekci 4.5.3.3, je mutace v *TP53* v PitNETech zcela raritní a v celém souboru 114 případů nebyl tzv. mutační typ exprese proteinu pozorován. Kromě výše uvedených klinickopatologických parametrů nebyla dále pozorována statisticky signifikantní souvislost mezi expresí p53 a dalšími faktory. Totéž se týká proliferativity tumorů stanovené dle systému Jacqueline Trouillas. Absence asociace s velikostí anebo hladinou IGF1 může být překvapivá, avšak nejspíše odráží podobný vztah Ki67 a těchto parametrů diskutovaný v začátku této sekce. Gradingový systém byl vytvořen na podkladě dat retrospektivní studie a je tedy možné, že údaje, které poskytuje, získávají klinický korelát až během follow-up onemocnění, jež je v tomto okamžiku již ovlivněno samotným terapeutickým zákrokem, a nemusí tedy automaticky souviset s vlastnostmi tumoru v době diagnózy, či před začátkem terapie. K tomu se dále pojí limitace naší studie diskutované v začátku této sekce. V souladu s literárním přehledem v sekci 4.5.3.2 byla mitotická aktivita v našem souboru nízká: v 69 tumorech (68 %) nebyly mitózy identifikovatelné, v 23 tumorech jsme našli jednu mitózu (23 %) a zbývajících 10 tumorech byla mitotická aktivita vyšší než 1/10 HPF. V provedených analýzách mitotická aktivita nefigurovala jako statisticky signifikantní parametr, s výjimkou korelační analýzy, kde mitotická aktivita pozitivně korelovala s hladinami IGF1 ( $p=0,45$ ,  $p=0,027$ ) ve skupině DGST. Je otázkou, nakolik je toto pozorování validní, vzhledem k tomu, že mitotická aktivita byla přítomná pouze v 7 z 27 těchto tumorů, přičemž v 6 z nich byla přítomná pouze 1 mitóza. Vzhledem k diskusi v předchozím odstavci jsme dodatečně porovnali DGST s mitotickou aktivitu a bez mitotické aktivity, avšak pacienti se nijak nelišili stran věku, indexu Ki67 anebo hladiny STH. Uvedený vztah může samozřejmě ilustrovat validní biologický fenomén, nicméně vzhledem k absenci literárních pramenů, jež by se v kontextu somatotropních tumorů hlouběji zabývaly významem mitotické aktivity nelze o

tomto nálezu poznamenat více nad rámec předchozí výše uvedeného a osobně se domníváme, že se jedná spíše o náhodný fenomén.

## **8.6 Faktory predikující odpověď na léčbu SSA**

Naše práce zahrnovala celkem 31 pacientů, u nichž bylo možné vyhodnotit redukci IGF1 po léčbě SSA při vyloučení předchozí či konkomitantní radioterapie. Z těchto 31 pacientů bylo 7 léčeno prostřednictvím SSA již před první operací a tyto pacienty jsme zahrnuli do analýzy odpovědi, neboť se po statistické stránce odlišovali pouze expresí Ki67 (viz výše). Tento postup je ostatně srovnatelný též s jinými provedenými studiemi (114, 134). Medián léčby v době vyhodnocení biochemické odpovědi byl 10,6 měsíce, což je časový interval plně srovnatelný s jinými pracemi (viz tabulka 4.11). V předkládaném literárním souhrnu (sekce 4.6.10) je naopak patrné, že část studií použila k hodnocení odpovědi na léčbu mnohem kratší časový interval (obvykle 3–6 měsíců). Tato skutečnost může na jedné ztížit srovnatelnost našich výsledků, na druhou stranu ilustruje dle názoru autora mnohem lépe biologickou dynamiku onemocnění. Vzhledem k absenci spolehlivých radiologických údajů jsme nebyli schopni analyzovat vývoj objemu tumoru v závislosti na léčbě, nicméně vzhledem k universálně přijímané roli IGF1 jakožto ukazatele aktivity onemocnění považujeme zvolený způsob hodnocení odpovědi za postačující. Ve skupině pacientů s neoadjuvantní terapií jsme pozorovali u 43 % případů morfologické změny, jež mohly souviset s vlastní farmakoterapií (viz sekce 8.5), přičemž jsme současně nezaznamenali signifikantní asociaci mezi těmito změnami a biochemickou léčebnou odpovědí. Tento náález je samozřejmě výrazně limitován množstvím pacientů, nebyl však nicméně zaznamenán ani v jiných dvou pracích zabývajících se tematikou změn v tumorech po předchozí léčbě SSA (114, 134); sám o sobě je navíc morfologický obraz spojený s léčbou SSA nespecifický a nelze tedy v bioptickém materiálu říci, odráží-li spontánní vlastnosti tumoru anebo léčebné změny (223). Pět pacientů bylo dále během analyzovaném intervalu současně léčeno dopaminovým agonistou cabergolinem. Rozhodnutí o dalším postupu bylo v tomto případě obtížnější, avšak nakonec jsme tyto pacienty ve studii ponechali, neboť se léčebná odpověď mezi touto podskupinou a zbytkem kohorty signifikantně nelišila. Toto rozhodnutí bylo do velké míry arbitrární, neboť 1) se jednalo o limitovaný vzorek a výpovědní hodnota statistické analýzy může být v tomto ohledu sporná. 2) Literární prameny zabývající se kombinační léčbou SSA a DA neposkytují jednoznačné vodítko, jak v této situaci postupovat, vzhledem k variabilní terapeutické odpovědi při kombinační terapii (173, 175, 176, 225). Současně je potřeba uvést, že 3 z 5 případů spadaly do kategorie SLT a jeden případ byl představován plurihormonálním

tumorem. Je otázkou, jaký význam hraje přítomnost prolaktin imunoreaktivních buněk a sérových hladin prolaktinu ve vztahu k terapeutické odpovědi na cabergolin. Některé práce poukázaly, že sérová hladina prolaktinu nehraje roli v predikci odpovědi na léčbu u kombinační terapie(176, 178, 225) a roli nehraje ani imunohistochemická pozitivita prolaktinu v tumoru(173, 176). Jiné studie naopak pozorovaly pozitivní vztah mezi sérovými hladinami prolaktinu a odpovědí na léčbu DA(173, 174). Tato otázka tedy není v současnosti jednoznačně zodpovězena. Z výše uvedených důvodů jsme tedy porovnali hladiny prolaktinu a množství imunoreaktivních buněk mezi oběma skupinami, přičemž jsme i přes vyšší hodnoty u pacientů léčených DA nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl od zbytku souboru léčeného monoterapií a tento nálezný dle našeho názoru dále, byť nepřímý, podporuje naše rozhodnutí. Před další interpretací výsledků v této části práce je ještě potřeba poznamenat, že výsledky analýzy jednotlivých histologických subtypů nejsou vzájemně zcela porovnatelné. Zatímco v SGST jsme srovnávali skupiny s redukcí IGF1 o více a o méně než 50 %, porovnávala analýza non-SGST skupinu pacientů s normalizací IGF1 a skupinu bez normalizace. Zdůvodnění tohoto postupu je uvedeno v části 7.4.6.3.

Jako prediktor lepší terapeutické odpovědi se jevil vyšší věk pacientů, a to jak v celém souboru ( $p=0,039$ ), tak v podskupině SGST tumorů, kde byla tato asociace ještě výraznější ( $p=0,01$ ) a skupina pacientů s příznivou odpovědí se mediánem lišila o celých 18 let. Nález podporovala též korelační analýza, kdy věk opět pozitivně koreloval s léčebnou odpovědí ( $p=0,39$ ). Tento výsledek není zcela neočekávaný a k obdobnému pozorování dospělo několik dalších prací(23, 131, 148, 202), ačkoliv ne všechny(130, 134). Mladší věk pacientů je častěji asociován s SGST subtypem a ten je dále spojen s nižší expresí SSTR2A a AIP. Přesný důvod této asociace není spolehlivě objasněn a některé další aspekty této souvislosti byly pojednány v sekci 8.5, spolu s problematikou exprese AIP. V případě našeho souboru lze usuzovat, že asociace mezi věkem a odpovědí je spojená právě s přítomností SGST subtypu, neboť celkem 8/10 pacientů se špatnou odpovědí náleželo k SGST, stejně jako všech 5 pacientů, u nichž došlo k menší než 20% redukcí IGF1 po léčbě. Dalším klinickým faktorem asociovaným s příznivou odpovědí byla vyšší hladina IGF1 ( $p=0,038$ ). Ačkoliv jsme pozorovali též odpovídající korelaci ( $p=0,37$ ), hladiny IGF1 se dále nijak neodlišovaly po zohlednění jednotlivých histologických podskupin. Obdobnou pozitivní asociaci mezi odpovědí na léčbu a hladinou IGF1 při diagnóze pozorovala pouze jediná další práce(199), jiné nepozorovaly souvislost žádnou (130, 131, 148, 202) anebo naopak pozorovaly souvislost opačného charakteru(100). Zbývající literární prameny citované v tomto pojednání se touto asociací

nezabývaly. Nejpravděpodobnější příčina tohoto pozorování je dle našeho názoru následující: jak již bylo uvedeno v sekci 8.2, non-SGST tumory vykazují vyšší produkci IGF1 na jednotku objemu tumoru ve srovnání s SGST(62). To znamená, že přítomnost větších SGST může vyrovnat přítomnost menších non-SGST v absolutní hladině IGF1 a je tedy možné, že variabilní výsledky jednotlivých studií stran prediktivní hodnoty IGF1 jsou alespoň zčásti způsobeny různým podílem SGST a non-SGST o různých velikostech. Výše popisovaná asociace v této práci by tedy opět ilustrovala převažující přítomnost SGST subtypu u pacientů s horší terapeutickou odpovědí. Tuto možnost dále podtrhuje negativní souvislost mezi odpovědí na léčbu a velikostí tumoru ( $p=0,006$ ), jež byla identifikovatelná též jako signifikantní korelační trend ( $p=-0,44$ ). Nádory se špatnou odpovědí byly sice v průměru o 10 mm větší, to ale v kontextu údajů o nižší produkci IGF1(62) a STH(69) na jednotku objemu těchto tumorů nevylučuje naše pozorování. Obdobná souvislost mezi velikostí a léčebnou odpovědí byla přítomna v některých dalších studiích(202, 215), zatímco jiné tento vztah nezaznamenaly(130, 148, 199); dle našeho názoru se v těchto odlišných závěrech nejspíše opět odráží rozdílné zastoupení jednotlivých subtypů. Roli v tomto případě však může hrát ještě další faktor: ve velké části uvedených prací, včetně té naší, předcházela léčbě SSA u většiny pacientů vlastní operace (SSA bylo tedy podáváno adjuvantně). Z těchto důvodů nelze spolehlivě vyloučit, zda se na tomto výsledku (a též na příznivé souvislosti s vyšší hladinou IGF1, jež může být spojena s relativně menšími non-SGST) nepodílí též vyšší pravděpodobnost většího pooperačního nádorového residua u velkých nádorů (viz sekce 4.5), spíše než přímé biologické vlastnosti tumorů ve vztahu k resistenci. Tuto možnost jsme však v naší práci nemohli blíže prostudovat kvůli absenci spolehlivých pooperačních radiologických nálezů a ve výše citovaných studiích nebyla ve většině případů též zohledněna. V naší studii byla vyšší hodnota Ki67 asociována s horší odpovědí na léčbu v korelační analýze ( $p=-0,54$ ), signifikantní rozdíl v Ki67 jsme ale zaznamenali pouze v podskupině SGST, a nikoliv v celé kohortě ( $p=0,17$ ). Vztah mezi vysokým indexem Ki67 a špatnou léčebnou odpovědí byl zaznamenán již dříve(79, 202, 215), ačkoliv existují studie, jež v tomto ohledu rozdíl nepozorovaly (148, 199). V práci zabývající se konkrétně touto problematikou byla exprese Ki67 signifikantně vyšší ve skupině SGST a nádory s vyšším Ki67 indexem byly též signifikantně větší. Vysoké Ki67 nezávisle predikovalo špatnou léčebnou odpověď i po zohlednění exprese SSTR2A(215). Příčina tohoto nálezu je obtížněji vysvětlitelná. Jak bylo diskutováno v sekci 8.5 s ohledem na prognostický význam Ki67, proliferační aktivita hraje roli v recidivě nádorů po inkompletním odstranění, přičemž SSA svými účinky proliferační aktivitu tlumí. Je tedy možné, že nádory s přirozenou vyšší proliferační aktivitou v době



diagnózy mohou být k tomuto účinku resistantnější, anebo vykazovat obdobnou relativní redukci proliferační aktivity, jež však v absolutním měřítku zcela nezabrání relapsu onemocnění. Vyšší index Ki67 je navíc v některých studiích asociován s vyšší invazivitou tumorů (např. právě(215)), což může sehrát roli v úspěšnosti chirurgické léčby.

Poněkud neobvyklým nálezem byla negativní korelace mezi léčebnou odpovědí a sérovou hladinou TSH. Je nutné znovu zdůraznit, že se sérové hladiny TSH u pacientů pohybovaly v normálním rozmezí, což limituje klinický význam tohoto nálezu. Může se ovšem jednat o reflexi biologického vztahu mezi SGST a plurihormonálními tumory, zmiňovaného dříve v této práci. Podobná může být příčina vyšších hladin prolaktinu u pacientů se špatnou odpovědí v celém souboru, ačkoliv tato závislost nedosáhla statistické signifikance ( $p=0,06$ ). Jako statisticky signifikantní prediktor léčebné odpovědi se z analyzovaných SSTR jevil pouze SSTR2A, zcela v souladu s rozsáhlými literárními prameny shrnutými v tabulce 4.11. Tento nález není překvapivý, neboť SSA první generace vykazují nejvyšší afinitu právě k SSTR2A. Ostatní receptory, ani D2DR, nehrály v rámci celé skupiny signifikantní roli v predikci léčebné odpovědi, s výjimkou SSTR5 v podskupině non-SGST (viz dále). Prediktorem negativní léčebné odpovědi se v naší studii dále jevila nízká exprese E-cadherinu ( $p=0,03$ ), obdobně jako ve dvou jiných pracích(145, 146). Dle autora se však nejedná o nezávislý ukazatel, ale o charakteristiku úzce asociovanou s histologickým subtypem. V případě (146) nebyl ve vlastní práci zohledněn histologický subtyp, přičemž navazující práce téhož autorského kolektivu prokázala v totožném souboru výraznou asociaci SGST s horší léčebnou odpovědí a s jadernou lokalizací E-cadherinu(62). Druhá studie v podstatě tyto výsledky zopakovala a prokázala, že E-cadherin je signifikantně méně exprimován v SGST a SGST i tumory s nízkou expresí E-cadherinu mají signifikantně horší terapeutickou odpověď(145). Naše studie dospěla v podstatě k totožnému nálezu. Samotnou expresi E-cadherinu ovšem nepovažujeme za nezávislý prediktivní faktor při zohlednění histologického subtypu a to z následujících dvou důvodů: ve skupině se špatnou terapeutickou odpovědí byli pouze dva pacienti z non-SGST podskupiny a jejich H-skóre představovalo 104 a 155; jednalo se tedy o úroveň exprese srovnatelnou s ostatními tumory ze skupiny s dobrou odpovědí, kde byl medián exprese 138. Dále jsme nepozorovali signifikantní rozdíl mezi expresí E-cadherinu u tumorů s různými terapeutickými odpověďmi v SGST a non-SGST skupinách. Neočekávaná byla absence vztahu mezi terapeutickou odpovědí a expresí AIP opakovaně prokázaná v několika studiích u sporadických adenomů(148, 199, 202), přičemž u pacientů s FIPA a mutací *AIP* je tento nález obvyklý(51). Dle názoru autora je příčinou této

diskrepance v naší práci problematické použití v současnosti dostupné protilátky (klon 35-2) a odpovídající optimalizace imunohistochemické reakce. Tento problém je in extenso diskutován v sekci 8.5. Další histologické parametry nehrály v predikci léčebné odpovědi roli s určitou výjimkou u proliferativních tumorů, jež vykazovaly trend k častějšímu výskytu ve skupině se špatnou léčebnou odpovědí ( $p=0,052$ ). Obdobně tumory odpovídající grade 2b dle Trouillas vykazovali v naší práci trend ( $p=0,52$ ) k špatné odpovědi na léčbu, v tomto ohledu však byla analýza limitovaná malým množstvím pacientů ( $n=16$ ). Uvedený nálezn je dle našeho názoru v souladu s údaji o častějším výskytu proliferujících nádorů v SGST podskupině a prediktivnímu významu proliferční aktivity.

V kontextu předchozích řádků pro nás byla neočekávaným nálezem absence statisticky signifikantního vztahu mezi odpovědí na léčbu a histologickým subtypem při použití dvoustupňové škály odpovědi, kdy asociace SGST se špatnou léčebnou odpovědí měla pouze charakter trendu ( $p=0,058$ ). Tato absence klinicky signifikantního vztahu má dle našeho názoru zajímavou implikaci: poukazuje totiž na skutečnost, že SGST nejsou klinicky, a nejspíše též biologicky uniformní jednotkou. Ve většině literárních pramenů zabývajících se touto tematikou je SGST subtyp ve srovnání s DGST signifikantně častěji rezistentní na léčbu SSA(62, 81, 145, 215). Toto pozorování ovšem neplatí paušálně pro všechny tumory a ve výše citovaných pracích bylo možné identifikovat celkem 17 % SGST, jež vykazovaly dobrou léčebnou odpověď. V našem případě byl podíl SGST s příznivou biochemickou odpovědí vyšší (50 %) a v tomto ohledu může hrát roli delší doba léčby u naší kohorty, ve srovnání s některými výše uvedenými studiemi. Výsledky však ilustrují skutečnost, že diagnóza SGST u pacientů s akromegalií nepředstavuje jednoznačný negativní prediktivní faktor. Z uvedených studií se podskupinou SGST s farmakologickou odpovědí blíže zabývala pouze jedna práce, ve které tyto tumory vykazovaly vyšší expresi SSTR2A(81). V naší práci byla tato asociace odpovědi s vyšší expresí SSTR2 též přítomná, navíc v SGST podskupině přetrvávala statisticky signifikantní asociace mezi léčebnou odpovědí a věkem, velikostí tumoru a Ki67. Dle našeho názoru ilustruje tento fakt nehomogenní biologický charakter SGST. Nález není zjevně asociován s množstvím fibrózních tělísek a neodráží tedy problematiku tranzicionálního nádorového subtypu diskutovaného v 8.4 (naopak, častější přítomnost fibrózních tělísek – a tedy tranzicionálního subtypu – byla u non-SGST asociována s normalizací hladin IGF1 a tento nálezn jen hraničně nedosáhl statistické významnosti ( $p=0,052$ )). Uvedený postřeh o heterogenním charakteru SGST je nepřímě reflektován i v jiných studiích: např. ve shlukové analýze somatotropních PitNETů na

podkladě radiologických a patologických charakteristik byly SGST zastoupeny ve dvou klinicky odlišných skupinách stran klinické prognózy onemocnění(23). Mnoho prací (ovšem nikoliv všechny – (148)) sice ilustrovalo horší terapeutickou odpověď u SGST, nicméně i v těchto případech lze identifikovat obvykle malou podskupinu SGST s přijatelnou odpovědí na léčbu SSA. Tento postřeh nás opět přivádí k otázce podskupiny tumorů s fenotypovou signaturou zahrnující mladší věk, častější příslušnost k SGST podskupině, větší velikost, vyšší Ki67 a rezistenci na terapii SSA první generace, jejíž potenciální existence byla v souvislosti s expresí AIP probírána v sekci 8.5. V rozsahu naší práce jsme nebyli schopni přesně identifikovat příčinu tohoto nálezu a je možné, že souvisí s epigenetickými faktory (vzhledem k relativně chudému genetickému nálezu u somatotropních SGST) anebo odráží přítomnost jiných klinickopatologických faktorů, jež jsme v naší práci neposuzovali. Přestože tedy nejsme momentálně schopni podepřít existenci tohoto myšlenkového konstruktů robustními empirickými daty, dle našeho názoru se jedná o cenný postřeh „čtený mezi řádky“, jenž by mohl v budoucnu složit jako podklad pro další experimentální práci.

Na závěr je potřeba reflektovat ještě nález týkající se odpovědi na léčbu u non-SGST. Jediným statisticky signifikantním faktorem, jímž se lišila skupina pacientů s dosaženou normalizací hladiny IGF1, byla vyšší exprese SSTR5. Zdá se tedy, že ve skupině těchto tumorů může hrát SSTR5 pozitivní roli, přičemž mechanismus tohoto fenoménu nelze zcela jednoznačně identifikovat z důvodů absence literárních údajů o prediktivním významu exprese SSTR5 v somatotropních PitNETech (viz 4.6.10). Dle osobního názoru autora však tento nález může odrážet vliv heterodimerizace SSTR2A a SSTR5 právě ve skupině tumorů, jež vykazovaly signifikantně vyšší expresi SSTR2A. In vitro vedla heterodimerizace SSTR2A a SSTR5 jednak k vyšší aktivitě SSTR2A dependentní intracelulární signalizace a dále zvyšovala míru recyklace receptoru na buněčnou membránu po předchozí internalizaci(121).

### **8.7 Metodické limitace této práce, problematika kombinační léčby SSA a DA ve studii**

Na závěr této práce je nutné kriticky zhodnotit některé metodické aspekty, jež dle autora této práce představují největší limitaci vlastní studie. Autor si je uvědomuje a připouští subjektivitu některých rozhodnutí, jež během analýzy dat učinil.

Nejprve je nutné podotknout, že zatímco patologické parametry byly v této studii získány standardizovanými a robustně definovanými postupy, klinická data byla získána z údajů registru pocházejících z jednotlivých terciárních center: autor předpokládá, že údaje byly v registru doplněny spolehlivě a pravdivě. Z vlastního registru byly dále získány údaje o

velikosti a objemu tumorů. V registru byly dostupné též další radiologické údaje (např. „intraselární lokalizace, supraselární šíření“), avšak vzhledem k absenci údajů ve formě přesně definovaných kategorií jsme se tyto údaje rozhodli nevyužít. Údaje o invazi dle Knospovy klasifikaci byly získány dodatečně revizí radiologických snímků dvěma neurochirurgy s expertní znalostí problematiky (doc. MUDr. Tomáš Česák, Ph.D. a prof. MUDr. David Netuka, Ph.D.).

Dále je nutné poukázat na výrazně limitovanou hodnotu některých provedených statistických analýz z důvodu malého množství vyšetřených případů, a to i přes snahu autora o co nejspolehlivější hodnocení (např. použitím Fischerova přesného testu). Tento problém se týká především podskupiny pacientů se současnou (ať už neoadjuvantní,  $n=4$ , anebo pooperační,  $n=5$ ) léčbou cabergolinem, kdy vliv této léčby stran změn patologických parametrů tumoru anebo stran modifikace léčebné odpovědi na SSA nebylo možné spolehlivě zhodnotit, přičemž relativní nedostatek literárních údajů (viz sekce 4.7.8) ztěžuje dále apriorní posouzení vlivu na klinickopatologické parametry tumorů. Data z britského registru pacientů s akromegalií uvádí normalizaci hladin IGF1 při monoterapii cabergolinem u přibližně 25 % pacientů ( $n=1140$ ), ve srovnání s až 50 % pacientů léčených monoterapií SSA ( $n=1702$ ). U pacientů léčených kombinací naopak docházelo k normalizaci hladin u 29-34 % ( $n=564$ ) (175); tento nálezn ovšem může reflektovat preferenční využití kombinační terapie u pacientů s velkými nádory, primárně resistantními na léčbu SSA. Existují studie, jež uvádí vyšší úspěšnost kombinační terapie (42 -52 %)(177), zatímco další práce nezaznamenaly výraznější benefit kombinační terapie(172, 173). Lze usuzovat, že u pacientů s kombinační terapií primárně nedošlo ke klinické odpovědi na cabergolin anebo byla nedostatečná. Dále je známo, že terapie cabergolinem výrazně zlepšuje subjektivní vnímání klinických příznaků akromegalie(153) a použití DA tedy nemusí nutně ilustrovat jeho objektivní účinnost na hladiny IGF1. V naší studii se navíc významně nelišila odpověď na léčbu u pacientů s monoterapií SSA a kombinační terapií s cabergolinem (sekce 7.4.2), ačkoliv analýza byla zatížena malým vzorkem pacientů. Z těchto důvodů se autor rozhodl ponechat pacienty léčené kombinací DA a SAA v jedné skupině pro účely hodnocení odpovědi na léčbu, ačkoliv uznává, že se jedná o do určité míry subjektivní rozhodnutí, jež nemusí být universálně přijímáno. Všichni pacienti, kteří byli léčení kombinací DA a SAA anebo pouze DA ( $n=1$ ) neoadjuvantně, byli zahrnuti do analýzy vlivu léčby na morfologické vlastnosti tumoru (sekce 7.2.1 a 7.2.2) a nalezené odlišnosti (nižší index Ki67 u skupiny léčené SSA) byly odpovídajícím způsobem zohledněny v dalších analýzách. Předmětem studie nebylo odlišit

vlivy předchozí léčby SSA a DA na studované tumory a autor tedy považuje tento způsob zohlednění předchozí terapie DA za postačující.

Poslední potenciálně kontroverzní problematikou je histologická subklasifikace části cytokeratin-negativních tumorů, k níž neexistuje v současné době konsenzuální stanovisko odborné obce. Touto problematikou se zabývala in extenso separátní část diskuse.

*„Všechny cesty jsou stejné, nevedou nikam. Jsou cesty, které vedou křovím nebo do křoví. Během svého života jsem prošel dlouhé, dlouhé cesty, ale nikam jsem se nedostal. Už rozumím otázce svého dobrodince. Má tato cesta srdce? Jestliže má, je to dobrá cesta. Jestliže nemá, není k ničemu. Ani jedna z nich nikam nevede. Ale jedna z nich srdce má a druhá nemá. Cesta po té první je radostná. Dokud po ní jdeš, jsi s ní zajedno. Ta druhá tě donutí, abys proklel svůj život. Ta první tě posiluje, ta druhá tě oslabuje.“*

*- Carlos Castaneda, Učení dona Juana*

## 9. Závěr

V předkládané práci jsme provedli zevrubnou analýzu patologických a klinických parametrů velkého souboru somatotropních PitNETů. Za hlavní přínos této práce považuje autor především zevrubnou a přesnou analýzu patologických parametrů a jejich korelaci s klinickými charakteristikami tumorů, kdy takto detailní a komplexní pojednání v rozsahu souboru (tj. 110 pacientů) nebylo ve světové literatuře dosud provedeno. Obdobně nebyla dosud v literatuře publikována zevrubnější korelace gradingového systému Jacqueline Trouillas a klinickopatologických charakteristik primárních tumorů u pacient s akromegalií. V neposlední řadě pak za výhodu této práce považujeme použití monoklonálních protilátek proti jednotlivým SSTR, jež jsou v současné době v literatuře upřednostňovány před staršími polyklonálními protilátkami, na nichž byla postavena větší část starších prací obdobného formátu.

Naše závěry ve většině případů korespondují s literárními poznatky o biologické a klinické povaze těchto tumorů a lze je shrnout v následujících bodech:

- 1) Epidemiologický i patologický profil naší kohorty byl srovnatelný s jinými publikovanými soubory.
- 2) Tumory pacientů léčených v minulosti SSA vykazovaly signifikantně nižší index Ki67.
- 3) Pacienti s agresivními tumory (grade 2b) byli signifikantně častěji mladší, přičemž jejich tumory byly větší a vykazovali sníženou expresi SSTR2A.
- 4) Cytokeratin-negativní tumory v naší studii nepředstavovaly biologicky a klinicky separátní kategorii.
- 5) Kategorie SGST v analýzách figurovala jako nejvíce odlišná podskupina tumorů; pacienti byli častěji mladší, tumory exprimovaly signifikantně méně E-cadherinu, SSTR1, SSTR2A a SSTR3 a signifikantně více SSTR5. Nízká exprese E-cadherinu byla nejcharakterističtějším znakem této skupiny nádorů.

- 6) Jednotlivé histologické subtypy tumorů se nelišily svými dalšími klinickými a radiologickými charakteristikami, ačkoliv skupina SGST vykazovala tendenci k větší velikosti ( $p=0,07$ ) ve srovnání s non-SGST tumory.
- 7) Velké tumory z SLT skupiny vykazovaly nižší expresi SSTR3 a D2DR ve srovnání s tumory malými.
- 8) Klinicky příznivým prediktorem léčby SSA se jevil vyšší věk, vyšší hladina IGF1 v době diagnózy, menší velikost tumoru, vyšší exprese SSTR2A a E-cadherinu. Pacienti s tumory grade 2b tumory vykazovaly trend ( $p=0,052$ ) k horší terapeutické odpovědi.
- 9) SGST subtyp vykazoval trend ( $p=0,06$ ) k horší léčebné odpovědi.
- 10) Nepodařilo se nám prokázat nezávislý prediktivní význam exprese E-cadherinu, který byl popsán v některých studiích. Asociace nízké hladiny E-cadherinu a špatné léčebné odpovědi demonstruje pouze horší léčebnou odpověď u části SGST.
- 11) Nepodařilo se nám prokázat prediktivní význam exprese AIP stanovené imunohistochemickou metodikou, který byl popsán v některých studiích. Tento nález má dle našeho názoru metodickou příčinu spočívající v absenci reprodučibilní kalibrace imunohistochemické reakce se v současnosti dostupnou protilátkou.
- 12) Podskupina pacientů s SGST vykazovala horší léčebnou odpověď: tito pacienti se vyznačovali signifikantně nižším věkem, větší velikost tumorů, vyšším indexem Ki67 a nižší expresí SSTR2A.
- 13) Ve skupině non-SGST predikovala vyšší exprese SSTR5 lepší terapeutickou odpověď.

## **10. Seznam popisků tabulek a obrazové dokumentace**

### **10.1 Seznam popisků tabulek**

<b>Tabulka 4.1 – Klasifikační schéma PitNETů (dle WHO). Pojem PitNET označuje WHO klasifikace standartně termínem adenom. Z důvodů uvedených v sekci 4.1.1 byla nomenklatura tabulky upravena pro účely této práce. ....</b>	<b>23</b>
<b>Tabulka 4.2 – Incidence jednotlivých patologických subtypů PitNETů (upraveno dle (20, 21)) .....</b>	<b>24</b>
<b>Tabulka 4.3 – Incidence jednotlivých patologických subtypů PitNETů u pacientů s akromegalií (převzato dle(15)).....</b>	<b>24</b>
<b>Tabulka 4.4 – Klinické projevy akromegalie a jejich prevalence (převzato z (34)).....</b>	<b>28</b>
<b>Tabulka 4.5 – Prognostický grading tumorů hypofýzy dle Trouillas et al. (1).....</b>	<b>42</b>
<b>Tabulka 4.6 – Hodnoty vazebných afinit somatostatinu a klinicky používaných SSA k jednotlivým subtypům SSSTR (dle (91)). Afinity jsou udány v IC<sub>50</sub> (nM); čím nižší je hodnota, tím vyšší je afinita látky k danému receptoru. ....</b>	<b>45</b>
<b>Tabulka 4.7 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí SSSTR1 v somatotropních tumorech.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabulka 4.8 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí SSSTR2 v somatotropních tumorech.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabulka 4.9 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí SSSTR3 v somatotropních tumorech.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabulka 4.10 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí SSSTR5 v somatotropních tumorech.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabulka 4.11 – Přehled vybraných studií zabývajících prediktivní rolí SSSTR2 v somatotropních PitNETech .....</b>	<b>57</b>
<b>Tabulka 4.12 – Přehled vybraných studií zabývajících se expresí D2DR v somatotropních tumorech.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabulka 4.13 – Přehled studií zabývajících se prediktivním významem D2DR v somatotropních tumorech.....</b>	<b>65</b>
<b>Tabulka 4.14 – Přehled studií zabývajících se expresí E-cadherinu v somatotropních PitNETech .....</b>	<b>70</b>
<b>Tabulka 4.15 – Přehled studií zabývajících se expresí AIP v somatotropních PitNETech .....</b>	<b>75</b>
<b>Tabulka 6.1 – Použité protilátky a detaily imunohistochemických reakcí .....</b>	<b>83</b>



Tabulka 7.1 – Množství pacientů v závislosti na jednotlivých pracovištích zapojených do studie.....	92
Tabulka 7.2 – Základní statistické parametry vyšetřeného souboru (n=110) pro intervalové proměnné. ....	92
Tabulka 7.3 – Četnosti zastoupení kategorických proměnných vyšetřeného souboru (n=110).....	93
Tabulka 7.4 – Rozdíly intervalových proměnných mezi skupinou předléčených (n=9) a nepředléčených pacientů (n=101) .....	96
Tabulka 7.5 - Rozdíly kategorických proměnných mezi skupinou předléčených (n=9) a nepředléčených pacientů (n=101) .....	97
Tabulka 7.6 – Přehled morfologických změn v tumorech po předchozí léčbě SSA/DA..	98
Tabulka 7.7 – Korelační analýza spojených patologických parametrů ve vztahu k prognostickým charakteristikám souboru. Jednotky kategorií jsou uvedeny v textu. Statisticky signifikantní hodnoty jsou vyznačeny tučným fontem.....	100
Tabulka 7.8 – Pearsonova korelace u dvojic parametrů se statisticky signifikantní hodnotou pro $\rho$ . ....	101
Tabulka 7.9 – Vliv pohlaví na klinickopatologické parametry souboru .....	102
Tabulka 7.10 – Analýza kategorických proměnných nádorů u mužů a u žen .....	103
Tabulka 7.11 – Vliv proliferativity na klinickopatologické parametry souboru.....	105
Tabulka 7.12 – Vliv invaze tumoru na klinickopatologické parametry souboru.....	106
Tabulka 7.13 – Vliv kompletního grade dle Trouillas na klinickopatologické parametry souboru .....	107
Tabulka 7.14 – Vliv absence exprese cytokeratinu 8/18 na vlastnosti zkoumaných tumorů.....	110
Tabulka 7.15 – Vybrané klinickopatologické charakteristiky cytokeratin-negativních tumorů (údaje STH, prolaktin a $\beta$ TSH charakterizují množství imunoreaktivních buněk).....	114
Tabulka 7.16 – Srovnání patologických parametrů skupiny SGST a non-SGST.....	118
Tabulka 7.17 – Srovnání patologických parametrů DGST, SLT a plurihormonálních tumorů .....	119
Tabulka 7.18 - Srovnání patologických parametrů skupiny SGST a non-SGST pro kategorické proměnné.....	120
Tabulka 7.19 - Srovnání patologických parametrů jednotlivých histologických subtypů pro kategorické proměnné.....	121

<b>Tabulka 7.20 – Srovnání patologických parametrů SGST, DGST, SLT a plurihormonálních tumorů.....</b>	<b>123</b>
<b>Tabulka 7.21 – Srovnání klinických parametrů mezi skupinou SGST a non-SGST.....</b>	<b>128</b>
<b>Tabulka 7.22 – Srovnání klinických parametrů mezi jednotlivými podtypy non-SGST .....</b>	<b>129</b>
<b>Tabulka 7.23 – Srovnání klinických parametrů mezi jednotlivými podtypy non-SGST .....</b>	<b>130</b>
<b>Tabulka 7.24 – Výsledky korelační analýzy pro jednotlivé histologické subtypy .....</b>	<b>131</b>
<b>Tabulka 7.25 – Velikost mediánů velikostí v jednotlivých podskupinách tumorů .....</b>	<b>134</b>
<b>Tabulka 7.26 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory v celé souboru .....</b>	<b>136</b>
<b>Tabulka 7.27 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u SGST .....</b>	<b>137</b>
<b>Tabulka 7.28 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u non-SGST.....</b>	<b>138</b>
<b>Tabulka 7.29 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u DGST.....</b>	<b>139</b>
<b>Tabulka 7.30 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u SLT .....</b>	<b>140</b>
<b>Tabulka 7.31 – Rozdíly v patologických parametrech mezi malými a velkými tumory u plurihormonálních tumorů .....</b>	<b>141</b>
<b>Tabulka 7.32 – Deskriptivní charakteristiky podsouboru léčeného SSA .....</b>	<b>142</b>
<b>Tabulka 7.33 – Kategorické charakteristiky podsouboru léčeného SSA .....</b>	<b>143</b>
<b>Tabulka 7.34 – Rozsah odpovědi na léčbu ve studované skupině pacientů .....</b>	<b>143</b>
<b>Tabulka 7.35 – Vliv klinických parametrů na léčebnou odpověď.....</b>	<b>146</b>
<b>Tabulka 7.36 – Analýza vlivu exprese somatostatinových receptorů na terapeutickou odpověď.....</b>	<b>147</b>
<b>Tabulka 7.37 – Analýza vlivu dalších histologických parametrů na terapeutickou odpověď.....</b>	<b>149</b>
<b>Tabulka 7.38 – Terapeutická odpověď v závislosti na histologickém subtypu tumoru</b>	<b>150</b>
<b>Tabulka 7.39 – Analýza prediktivních faktorů ve skupině SGST .....</b>	<b>151</b>
<b>Tabulka 7.40 – Prediktivní vliv klinických a patologických faktorů na normalizaci IGF1 u pacientů s non-SGST .....</b>	<b>152</b>

## 10.2 Seznam popisků obrázků

Obrázek 6.1 – Expresí prolaktinu v jednom z tumorů SLT skupiny (200x zvětšení) .....	80
Obrázek 6.2 – Expresí $\beta$ TSH v jednom z tumorů plurihormonální skupiny (200x zvětšení) .....	81
Obrázek 6.3 – Perinukleární expresí cytokeratinu 18 v jednom z tumorů DGST skupiny (400x zvětšení) .....	82
Obrázek 6.4 – Fibrózní tělíska pozitivní v průkazu cytokeratinu 18 v jednom z tumorů SGST skupiny (200x zvětšení) .....	82
Obrázek 6.5 – Intenzity expresí SSTR1 (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). .....	85
Obrázek 6.6 – Intenzity expresí SSTR2 (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). .....	85
Obrázek 6.7 – Intenzity expresí SSTR3 (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). .....	86
Obrázek 6.8 – Intenzity expresí SSTR5 (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). .....	86
Obrázek 6.9 - Intenzity expresí D2DR (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (pankreas). .....	87
Obrázek 6.10 – Intenzity expresí E-cadherinu (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (apendix). .....	88
Obrázek 6.11 – Intenzity expresí AIP (200x zvětšení). A) slabá pozitivita, B) středně silná pozitivita, C) silná pozitivita, D) pozitivní kontrola (varle) .....	88
Obrázek 7.1 – Tumor č. 6 z tabulky 5.14, klasifikovaný vzhledem k morfologii a expresi STH jako DGST i přes absenci perinukleární expresí cytokeratinu 18 (H&E, 200x zvětšení) .....	111
Obrázek č. 7.2 – Expresí STH v tumoru č. 8 z tabulky 5.14, jenž byl klasifikován jako DGST i přes absenci perinukleární expresí cytokeratinu 18.(STH imunohistochemie, 200x zvětšení) .....	111
Obrázek 7.3 – Tumor č. 2 z tabulky 5.14, v tumoru byla přítomná slabá expresí GATA3, jež spolu s morfologickým nálezem umožnila tumor klasifikovat jako PPPT (GATA3 imunohistochemie, 400x zvětšení) .....	112
Obrázek 7.4 – Tumor č. 1 z tabulky 5.14, jenž byl klasifikován jako PPPT na podkladě morfologie a fokální expresí $\beta$ TSH (H&E, 200x zvětšení) .....	112

<b>Obrázek 7.5 – Tumor ze skupiny DGST (H&amp;E, 200x zvětšení).....</b>	<b>115</b>
<b>Obrázek 7.6 – Tumor ze skupiny SGST (H&amp;E, 200x zvětšení) .....</b>	<b>116</b>
<b>Obrázek 7.7 – Tumor ze skupiny plurihormonálních nádorů (H&amp;E, 200x zvětšení)....</b>	<b>116</b>
<b>Obrázek 7.8 - Tumor ze skupiny SLT. V levé části obrázku je patrná populace buněk s objemnou eosinofilní cytoplasmou, jež by v imunohistochemickém průkazu STH byly pozitivní. V pravé části je populace menších a chromofobních buněk, jež by exprimovala prolaktin (H&amp;E, 400x zvětšení).....</b>	<b>117</b>
<b>Obrázek 7.9 – Expresse <math>\beta</math>TSH v nádoru, jenž splňoval definici pro SGST (400x zvětšení) .....</b>	<b>127</b>
<b>Obrázek 8.1 – Expresse cytokeratinu 18 vykazovala v některých tumorech oba vzory exprese. Na pravé straně obrázku jsou fibrózní tělíska, zatímco v levé části převládá perinukleární lokalizace (400x zvětšení) .....</b>	<b>162</b>

### 10.3 Seznam popisků grafů

<b>Graf č. 7.1 – Pohlaví pacientů ve studii .....</b>	<b>93</b>
<b>Graf č. 7.2 – Invazivita tumorů ve studii.....</b>	<b>93</b>
<b>Graf č. 7.3 – Zastoupení jednotlivých kategorií grade dle Trouillas .....</b>	<b>94</b>
<b>Graf č. 7.4 – Zastoupení jednotlivých velikostních kategorií v souboru .....</b>	<b>94</b>
<b>Graf č. 7.5 – Rozdíl indexu Ki67 mezi pacienty s předchozí léčbou SSA a bez léčby .....</b>	<b>97</b>
<b>Graf č. 7.6 – Rozdíl ve věku mezi pacienty s proliferujícími a neproliferujícími tumory .....</b>	<b>104</b>
<b>Graf č. 7.7 – Rozdíly H-skóre jednotlivých proteinů mezi skupinami SGST a non-SGST .....</b>	<b>122</b>
<b>Graf č. 7.8 - Rozdíly H-skóre jednotlivých proteinů mezi jednotlivými histologickými podtypy tumorů .....</b>	<b>124</b>
<b>Graf č. 7.9 – ROC křivky pro SSTR2A, SSTR3 a E-cadherin.....</b>	<b>125</b>
<b>Graf č. 7.10 - ROC křivka pro SSTR5 .....</b>	<b>126</b>
<b>Graf č. 7.11 – Zastoupení terapeutických odpovědí na 4-stupňové škále hodnocení.....</b>	<b>144</b>
<b>Graf č. 7.12 – Zastoupení terapeutických odpovědí na 2-stupňové škále hodnocení.....</b>	<b>144</b>
<b>Graf č. 7.13 – Rozdíly v H-skóre studovaných proteinů mezi skupinou pacientů s dobrou a špatnou terapeutickou odpovědí. ....</b>	<b>148</b>

## 11. Seznam citací použité literatury

1. Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol.* 2013;126(1):123-35.
2. Asa SL, Casar-Borota O, Chanson P, Delgrange E, Earls P, Ezzat S, et al. From pituitary adenoma to pituitary neuroendocrine tumor (PitNET): an International Pituitary Pathology Club proposal. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(4):C5-C8.
3. Lloyd RV OR, Klöppel G, Rosai J (eds.). WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. Fourth Edition. Lloyd RV OR, Klöppel G, Rosai J (eds.), editor. Lyon, France: IARC; 2017. 355 p.
4. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol.* 2018;20(suppl\_4):iv1-iv86.
5. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer.* 2004;101(3):613-9.
6. McDowell BD, Wallace RB, Carnahan RM, Chrischilles EA, Lynch CF, Schlechte JA. Demographic differences in incidence for pituitary adenoma. *Pituitary.* 2011;14(1):23-30.
7. Karavitaki N. Prevalence and incidence of pituitary adenomas. *Ann Endocrinol (Paris).* 2012;73(2):79-80.
8. Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas.* 2010;39(6):707-12.
9. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry : theranostic and genomic applications. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010. xviii, 941 p. p.
10. Coons SW, Estrada SI, Gamez R, White WL. Cytokeratin CK 7 and CK 20 expression in pituitary adenomas. *Endocr Pathol.* 2005;16(3):201-10.
11. Duan K, Mete O. Algorithmic approach to neuroendocrine tumors in targeted biopsies: Practical applications of immunohistochemical markers. *Cancer Cytopathol.* 2016;124(12):871-84.
12. Asa SL. Tumors of the pituitary gland. Washington, D.C.: American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology; 2011.

13. Kleinschmidt-DeMasters BK, Lopes MB, Prayson RA. An algorithmic approach to sellar region masses. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(3):356-72.
14. Osamura RY, Kajiya H, Takei M, Egashira N, Tobita M, Takekoshi S, et al. Pathology of the human pituitary adenomas. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(3):495-507.
15. Syro LV, Rotondo F, Serna CA, Ortiz LD, Kovacs K. Pathology of GH-producing pituitary adenomas and GH cell hyperplasia of the pituitary. *Pituitary*. 2017;20(1):84-92.
16. Villa C, Vasiljevic A, Jaffrain-Rea ML, Ansorge O, Asioli S, Barresi V, et al. A standardised diagnostic approach to pituitary neuroendocrine tumours (PitNETs): a European Pituitary Pathology Group (EPPG) proposal. *Virchows Arch*. 2019.
17. Manojlovic-Gacic E, Engstrom BE, Casar-Borota O. Histopathological classification of non-functioning pituitary neuroendocrine tumors. *Pituitary*. 2018;21(2):119-29.
18. Mete O, Kefeli M, Caliskan S, Asa SL. GATA3 immunoreactivity expands the transcription factor profile of pituitary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol*. 2019;32(4):484-9.
19. Lopes MB. Growth hormone-secreting adenomas: pathology and cell biology. *Neurosurg Focus*. 2010;29(4):E2.
20. Arafah BM, Nasrallah MP. Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocr Relat Cancer*. 2001;8(4):287-305.
21. Nishioka H, Inoshita N, Mete O, Asa SL, Hayashi K, Takeshita A, et al. The Complementary Role of Transcription Factors in the Accurate Diagnosis of Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol*. 2015;26(4):349-55.
22. Obari A, Sano T, Ohyama K, Kudo E, Qian ZR, Yoneda A, et al. Clinicopathological features of growth hormone-producing pituitary adenomas: difference among various types defined by cytokeratin distribution pattern including a transitional form. *Endocr Pathol*. 2008;19(2):82-91.
23. Cuevas-Ramos D, Carmichael JD, Cooper O, Bonert VS, Gertych A, Mamelak AN, et al. A structural and functional acromegaly classification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(1):122-31.
24. Bakhtiar Y, Hirano H, Arita K, Yunoue S, Fujio S, Tominaga A, et al. Relationship between cytokeratin staining patterns and clinico-pathological features in somatotropinoma. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(4):531-9.
25. Sarkar S, Chacko AG, Chacko G. An analysis of granulation patterns, MIB-1 proliferation indices and p53 expression in 101 patients with acromegaly. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014;156(12):2221-30; discussion 30.

26. Mori R, Inoshita N, Takahashi-Fujigasaki J, Joki T, Nishioka H, Abe T, et al. Clinicopathological Features of Growth Hormone-Producing Pituitary Adenomas in 242 Acromegaly Patients: Classification according to Hormone Production and Cytokeratin Distribution. *ISRN Endocrinol*. 2013;2013:723432.
27. Ho DM, Hsu CY, Ting LT, Chiang H. Plurihormonal pituitary adenomas: immunostaining of all pituitary hormones is mandatory for correct classification. *Histopathology*. 2001;39(3):310-9.
28. Horvath E, Kovacs K, Singer W, Smyth HS, Killinger DW, Erzin C, et al. Acidophil stem cell adenoma of the human pituitary: clinicopathologic analysis of 15 cases. *Cancer*. 1981;47(4):761-71.
29. Mete O, Gomez-Hernandez K, Kucharczyk W, Ridout R, Zadeh G, Gentili F, et al. Silent subtype 3 pituitary adenomas are not always silent and represent poorly differentiated monomorphous plurihormonal Pit-1 lineage adenomas. *Mod Pathol*. 2016;29(2):131-42.
30. Richardson TE, Mathis DA, Mickey BE, Raisanen JM, Burns DK, White CL, 3rd, et al. Clinical Outcome of Silent Subtype III Pituitary Adenomas Diagnosed by Immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74(12):1170-7.
31. Erickson D, Scheithauer B, Atkinson J, Horvath E, Kovacs K, Lloyd RV, et al. Silent subtype 3 pituitary adenoma: a clinicopathologic analysis of the Mayo Clinic experience. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(1):92-9.
32. Horvath E, Kovacs K, Smyth HS, Cusimano M, Singer W. Silent adenoma subtype 3 of the pituitary--immunohistochemical and ultrastructural classification: a review of 29 cases. *Ultrastruct Pathol*. 2005;29(6):511-24.
33. Lugo G, Pena L, Cordido F. Clinical manifestations and diagnosis of acromegaly. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:540398.
34. Vilar L, Vilar CF, Lyra R, Lyra R, Naves LA. Acromegaly: clinical features at diagnosis. *Pituitary*. 2017;20(1):22-32.
35. Goyal N, Borkar SA, Agrawal D, Mahapatra AK. Pituitary adenoma presenting with cerebrospinal fluid rhinorrhea as the sole symptom. *Neurol India*. 2012;60(3):307-8.
36. Briet C, Salenave S, Bonneville JF, Laws ER, Chanson P. Pituitary Apoplexy. *Endocr Rev*. 2015;36(6):622-45.
37. Arafah BM, Prunty D, Ybarra J, Hlavín ML, Selman WR. The dominant role of increased intrasellar pressure in the pathogenesis of hypopituitarism, hyperprolactinemia, and headaches in patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(5):1789-93.

38. Kruse A, Astrup J, Gyldensted C, Cold GE. Hyperprolactinaemia in patients with pituitary adenomas. The pituitary stalk compression syndrome. *Br J Neurosurg.* 1995;9(4):453-7.
39. Giustina A, Chanson P, Bronstein MD, Klibanski A, Lamberts S, Casanueva FF, et al. A consensus on criteria for cure of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3141-8.
40. Colao A, Grasso LFS, Giustina A, Melmed S, Chanson P, Pereira AM, et al. Acromegaly. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):20.
41. Davies BM, Carr E, Soh C, Gnanalingham KK. Assessing size of pituitary adenomas: a comparison of qualitative and quantitative methods on MR. *Acta Neurochir (Wien).* 2016;158(4):677-83.
42. Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas--diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(7):423-35.
43. Marek J. [Contemporary options and perspectives in the treatment of acromegaly]. *Cas Lek Cesk.* 2014;153(3):131-6.
44. Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery.* 1993;33(4):610-7; discussion 7-8.
45. Nomikos P, Buchfelder M, Fahlbusch R. The outcome of surgery in 668 patients with acromegaly using current criteria of biochemical 'cure'. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(3):379-87.
46. Hardy J, Vezina JL. Transsphenoidal neurosurgery of intracranial neoplasm. *Adv Neurol.* 1976;15:261-73.
47. Mooney MA, Hardesty DA, Sheehy JP, Bird CR, Chapple K, White WL, et al. Rater Reliability of the Hardy Classification for Pituitary Adenomas in the Magnetic Resonance Imaging Era. *J Neurol Surg B Skull Base.* 2017;78(5):413-8.
48. Melmed S, Bronstein MD, Chanson P, Klibanski A, Casanueva FF, Wass JAH, et al. A Consensus Statement on acromegaly therapeutic outcomes. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(9):552-61.
49. Chen CJ, Ironside N, Pomeranec IJ, Chivukula S, Buell TJ, Ding D, et al. Microsurgical versus endoscopic transsphenoidal resection for acromegaly: a systematic review of outcomes and complications. *Acta Neurochir (Wien).* 2017;159(11):2193-207.
50. Jezkova J, Marek J, Hana V, Krsek M, Weiss V, Vladyka V, et al. Gamma knife radiosurgery for acromegaly--long-term experience. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;64(5):588-95.



51. Gadelha MR, Kasuki L, Korbonits M. The genetic background of acromegaly. *Pituitary*. 2017;20(1):10-21.
52. Valimaki N, Demir H, Pitkanen E, Kaasinen E, Karppinen A, Kivipelto L, et al. Whole-Genome Sequencing of Growth Hormone (GH)-Secreting Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(10):3918-27.
53. Ronchi CL, Peverelli E, Herterich S, Weigand I, Mantovani G, Schwarzmayr T, et al. Landscape of somatic mutations in sporadic GH-secreting pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(3):363-72.
54. Beckers A, Daly AF. The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(4):371-82.
55. Cazabat L, Bouligand J, Salenave S, Bernier M, Gaillard S, Parker F, et al. Germline AIP mutations in apparently sporadic pituitary adenomas: prevalence in a prospective single-center cohort of 443 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(4):E663-70.
56. Araujo PB, Kasuki L, de Azeredo Lima CH, Ogino L, Camacho AHS, Chimelli L, et al. AIP mutations in Brazilian patients with sporadic pituitary adenomas: a single-center evaluation. *Endocr Connect*. 2017;6(8):914-25.
57. Spada A, Lania A, Ballare E. G protein abnormalities in pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;142(1-2):1-14.
58. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(5):257-66.
59. Larkin S, Reddy R, Karavitaki N, Cudlip S, Wass J, Ansorge O. Granulation pattern, but not GSP or GHR mutation, is associated with clinical characteristics in somatostatin-naïve patients with somatotroph adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(4):491-9.
60. Asa SL, Digiovanni R, Jiang J, Ward ML, Loesch K, Yamada S, et al. A growth hormone receptor mutation impairs growth hormone autofeedback signaling in pituitary tumors. *Cancer Res*. 2007;67(15):7505-11.
61. Mayr B, Buslei R, Theodoropoulou M, Stalla GK, Buchfelder M, Schofl C. Molecular and functional properties of densely and sparsely granulated GH-producing pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(4):391-400.
62. Fougner SL, Casar-Borota O, Heck A, Berg JP, Bollerslev J. Adenoma granulation pattern correlates with clinical variables and effect of somatostatin analogue treatment in a large series of patients with acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(1):96-102.
63. Marazuela M, Paniagua AE, Gahete MD, Lucas T, Alvarez-Escola C, Manzanares R, et al. Somatotroph tumor progression during pegvisomant therapy: a clinical and molecular study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(2):E251-9.

64. Bevan JS. Clinical review: The antitumoral effects of somatostatin analog therapy in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1856-63.
65. Sherlock M, Fernandez-Rodriguez E, Alonso AA, Reulen RC, Ayuk J, Clayton RN, et al. Medical therapy in patients with acromegaly: predictors of response and comparison of efficacy of dopamine agonists and somatostatin analogues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(4):1255-63.
66. Kim JH, Hur KY, Lee JH, Lee JH, Se YB, Kim HI, et al. Outcome of Endoscopic Transsphenoidal Surgery for Acromegaly. *World Neurosurg.* 2017;104:272-8.
67. Jane JA, Jr., Starke RM, Elzoghby MA, Reames DL, Payne SC, Thorner MO, et al. Endoscopic transsphenoidal surgery for acromegaly: remission using modern criteria, complications, and predictors of outcome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(9):2732-40.
68. Nishioka H, Haraoka J, Akada K. Fibrous bodies are associated with lower GH production and decreased expression of E-cadherin in GH-producing pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;59(6):768-72.
69. Schwyzer L, Starke RM, Jane JA, Jr., Oldfield EH. Percent reduction of growth hormone levels correlates closely with percent resected tumor volume in acromegaly. *J Neurosurg.* 2015;122(4):798-802.
70. Trouillas J. In search of a prognostic classification of endocrine pituitary tumors. *Endocr Pathol.* 2014;25(2):124-32.
71. DeLellis RA. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon ; [Great Britain]: IARC Press; 2004.
72. Rindi G, Klimstra DS, Abedi-Ardekani B, Asa SL, Bosman FT, Brambilla E, et al. A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal. *Mod Pathol.* 2018;31(12):1770-86.
73. Miermeister CP, Petersenn S, Buchfelder M, Fahlbusch R, Ludecke DK, Holsken A, et al. Histological criteria for atypical pituitary adenomas - data from the German pituitary adenoma registry suggests modifications. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3:50.
74. Thapar K, Yamada Y, Scheithauer B, Kovacs K, Yamada S, Stefaneanu L. Assessment of Mitotic Activity in Pituitary Adenomas and Carcinomas. *Endocr Pathol.* 1996;7(3):215-21.
75. Thapar K, Scheithauer BW, Kovacs K, Pernicone PJ, Laws ER, Jr. p53 expression in pituitary adenomas and carcinomas: correlation with invasiveness and tumor growth fractions. *Neurosurgery.* 1996;38(4):765-70; discussion 70-1.

76. Gejman R, Swearingen B, Hedley-Whyte ET. Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Hum Pathol.* 2008;39(5):758-66.
77. Alimohamadi M, Ownagh V, Mahouzi L, Ostovar A, Abbassioun K, Amirjmshidi A. The impact of immunohistochemical markers of Ki-67 and p53 on the long-term outcome of growth hormone-secreting pituitary adenomas: A cohort study. *Asian J Neurosurg.* 2014;9(3):130-6.
78. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
79. Fusco A, Zatelli MC, Bianchi A, Cimino V, Tilaro L, Veltri F, et al. Prognostic significance of the Ki-67 labeling index in growth hormone-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(7):2746-50.
80. Chinezu L, Vasiljevic A, Trouillas J, Lapoirie M, Jouanneau E, Raverot G. Silent somatotroph tumour revisited from a study of 80 patients with and without acromegaly and a review of the literature. *Eur J Endocrinol.* 2017;176(2):195-201.
81. Brzana J, Yedinak CG, Gultekin SH, Delashaw JB, Fleseriu M. Growth hormone granulation pattern and somatostatin receptor subtype 2A correlate with postoperative somatostatin receptor ligand response in acromegaly: a large single center experience. *Pituitary.* 2013;16(4):490-8.
82. Kiseljak-Vassiliades K, Carlson NE, Borges MT, Kleinschmidt-DeMasters BK, Lillehei KO, Kerr JM, et al. Growth hormone tumor histological subtypes predict response to surgical and medical therapy. *Endocrine.* 2015;49(1):231-41.
83. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20(3):157-98.
84. Unger N, Ueberberg B, Schulz S, Saeger W, Mann K, Petersenn S. Differential expression of somatostatin receptor subtype 1-5 proteins in numerous human normal tissues. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012;120(8):482-9.
85. Chalabi M, Duluc C, Caron P, Vezzosi D, Guillermet-Guibert J, Pyronnet S, et al. Somatostatin analogs: does pharmacology impact antitumor efficacy? *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(3):115-27.
86. Schulz S, Schulz S, Schmitt J, Wiborny D, Schmidt H, Olbricht S, et al. Immunocytochemical detection of somatostatin receptors sst1, sst2A, sst2B, and sst3 in paraffin-embedded breast cancer tissue using subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res.* 1998;4(9):2047-52.

87. Patel YC, Greenwood M, Kent G, Panetta R, Srikant CB. Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192(1):288-94.
88. Duran-Prado M, Gahete MD, Martinez-Fuentes AJ, Luque RM, Quintero A, Webb SM, et al. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(7):2634-43.
89. Eigler T, Ben-Shlomo A. Somatostatin system: molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(1):R1-19.
90. Weis WI, Kobilka BK. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem.* 2018;87:897-919.
91. Ben-Shlomo A, Melmed S. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(3):123-33.
92. Theodoropoulou M, Stalla GK. Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol.* 2013;34(3):228-52.
93. Oberg K, Lamberts SW. Somatostatin analogues in acromegaly and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: past, present and future. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(12):R551-R66.
94. Gadelha MR, Wildemberg LE, Bronstein MD, Gatto F, Ferone D. Somatostatin receptor ligands in the treatment of acromegaly. *Pituitary.* 2017;20(1):100-8.
95. Yau H, Kinaan M, Quinn SL, Moraitis AG. Octreotide long-acting repeatable in the treatment of neuroendocrine tumors: patient selection and perspectives. *Biologics.* 2017;11:115-22.
96. Burness CB, Dhillon S, Keam SJ. Lanreotide autogel((R)): a review of its use in the treatment of patients with acromegaly. *Drugs.* 2014;74(14):1673-91.
97. Petersenn S, Bollerslev J, Arafat AM, Schopohl J, Serri O, Katznelson L, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of pasireotide LAR in patients with acromegaly: a randomized, multicenter, open-label, phase I study. *J Clin Pharmacol.* 2014;54(11):1308-17.
98. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang XY. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol.* 2016;428(19):3850-68.
99. Colao A, Auriemma RS, Lombardi G, Pivonello R. Resistance to somatostatin analogs in acromegaly. *Endocr Rev.* 2011;32(2):247-71.

100. Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3):R223-40.
101. White RE, Schonbrunn A, Armstrong DL. Somatostatin stimulates Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels through protein dephosphorylation. *Nature*. 1991;351(6327):570-3.
102. Cerovac V, Monteserin-Garcia J, Rubinfeld H, Buchfelder M, Losa M, Florio T, et al. The somatostatin analogue octreotide confers sensitivity to rapamycin treatment on pituitary tumor cells. *Cancer Res*. 2010;70(2):666-74.
103. Guillermet-Guibert J, Saint-Laurent N, Davenne L, Rochaix P, Cuvillier O, Culler MD, et al. Novel synergistic mechanism for sst2 somatostatin and TNFalpha receptors to induce apoptosis: crosstalk between NF-kappaB and JNK pathways. *Cell Death Differ*. 2007;14(2):197-208.
104. Ferrante E, Pellegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Locatelli M, Gelmini P, et al. Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(3):955-62.
105. Lawnicka H, Pisarek H, Kunert-Radek J, Pawlikowski M. Effects of somatostatin on vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from non-functioning pituitary tumoral cells incubated in vitro. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29(1):113-6.
106. Zatelli MC, Piccin D, Vignali C, Tagliati F, Ambrosio MR, Bondanelli M, et al. Pasireotide, a multiple somatostatin receptor subtypes ligand, reduces cell viability in non-functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(1):91-102.
107. Curtis SB, Hewitt J, Yakubovitz S, Anzarut A, Hsiang YN, Buchan AM. Somatostatin receptor subtype expression and function in human vascular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(6):H1815-22.
108. Watson JC, Balster DA, Gebhardt BM, O'Dorisio TM, O'Dorisio MS, Espenan GD, et al. Growing vascular endothelial cells express somatostatin subtype 2 receptors. *Br J Cancer*. 2001;85(2):266-72.
109. Florio T, Morini M, Villa V, Arena S, Corsaro A, Thellung S, et al. Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology*. 2003;144(4):1574-84.
110. Hukovic N, Panetta R, Kumar U, Patel YC. Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation. *Endocrinology*. 1996;137(9):4046-9.

111. Sarret P, Nouel D, Dal Farra C, Vincent JP, Beaudet A, Mazella J. Receptor-mediated internalization is critical for the inhibition of the expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT-20. *J Biol Chem*. 1999;274(27):19294-300.
112. Calebiro D, Godbole A. Internalization of G-protein-coupled receptors: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2018;32(2):83-91.
113. Hipkin RW, Friedman J, Clark RB, Eppler CM, Schonbrunn A. Agonist-induced desensitization, internalization, and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor. *J Biol Chem*. 1997;272(21):13869-76.
114. Casar-Borota O, Heck A, Schulz S, Nesland JM, Ramm-Petersen J, Lekva T, et al. Expression of SSTR2a, but not of SSTRs 1, 3, or 5 in somatotroph adenomas assessed by monoclonal antibodies was reduced by octreotide and correlated with the acute and long-term effects of octreotide. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(11):E1730-9.
115. Tower-Gilchrist C, Lee E, Sztul E. Endosomal trafficking of the G protein-coupled receptor somatostatin receptor 3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(4):555-60.
116. Peverelli E, Mantovani G, Calebiro D, Doni A, Bondioni S, Lania A, et al. The third intracellular loop of the human somatostatin receptor 5 is crucial for arrestin binding and receptor internalization after somatostatin stimulation. *Mol Endocrinol*. 2008;22(3):676-88.
117. Ben-Shlomo A, Wawrowsky KA, Proekt I, Wolkenfeld NM, Ren SG, Taylor J, et al. Somatostatin receptor type 5 modulates somatostatin receptor type 2 regulation of adrenocorticotropin secretion. *J Biol Chem*. 2005;280(25):24011-21.
118. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp HJ, et al. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem*. 2001;276(17):14027-36.
119. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*. 2000;288(5463):154-7.
120. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem*. 2000;275(11):7862-9.
121. Grant M, Alturaihi H, Jaquet P, Collier B, Kumar U. Cell growth inhibition and functioning of human somatostatin receptor type 2 are modulated by receptor heterodimerization. *Mol Endocrinol*. 2008;22(10):2278-92.

122. Shimon I. Somatostatin receptors in pituitary and development of somatostatin receptor subtype-selective analogs. *Endocrine*. 2003;20(3):265-9.
123. Miller GM, Alexander JM, Bikkal HA, Katznelson L, Zervas NT, Klibanski A. Somatostatin receptor subtype gene expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(4):1386-92.
124. Panetta R, Patel YC. Expression of mRNA for all five human somatostatin receptors (hSSTR1-5) in pituitary tumors. *Life Sci*. 1995;56(5):333-42.
125. Chinezu L, Vasiljevic A, Jouanneau E, Francois P, Borda A, Trouillas J, et al. Expression of somatostatin receptors, SSTR2A and SSTR5, in 108 endocrine pituitary tumors using immunohistochemical detection with new specific monoclonal antibodies. *Hum Pathol*. 2014;45(1):71-7.
126. Lupp A, Hunder A, Petrich A, Nagel F, Doll C, Schulz S. Reassessment of sst(5) somatostatin receptor expression in normal and neoplastic human tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-4. *Neuroendocrinology*. 2011;94(3):255-64.
127. Lupp A, Nagel F, Doll C, Rocken C, Evert M, Mawrin C, et al. Reassessment of sst3 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-5. *Neuroendocrinology*. 2012;96(4):301-10.
128. Lupp A, Nagel F, Schulz S. Reevaluation of sst(1) somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-7. *Regul Pept*. 2013;183:1-6.
129. Taboada GF, Luque RM, Neto LV, Machado Ede O, Sbaffi BC, Domingues RC, et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *Eur J Endocrinol*. 2008;158(3):295-303.
130. Venegas-Moreno E, Vazquez-Borrego MC, Dios E, Gros-Herguido N, Flores-Martinez A, Rivero-Cortes E, et al. Association between dopamine and somatostatin receptor expression and pharmacological response to somatostatin analogues in acromegaly. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):1640-9.
131. Casarini AP, Jallad RS, Pinto EM, Soares IC, Nonogaki S, Giannella-Neto D, et al. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary*. 2009;12(4):297-303.
132. Neto LV, Machado Ede O, Luque RM, Taboada GF, Marcondes JB, Chimelli LM, et al. Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between

dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(6):1931-7.

133. Kiseljak-Vassiliades K, Xu M, Mills TS, Smith EE, Silveira LJ, Lillehei KO, et al. Differential somatostatin receptor (SSTR) 1-5 expression and downstream effectors in histologic subtypes of growth hormone pituitary tumors. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;417:73-83.

134. Plockinger U, Albrecht S, Mawrin C, Saeger W, Buchfelder M, Petersenn S, et al. Selective loss of somatostatin receptor 2 in octreotide-resistant growth hormone-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1203-10.

135. Schmid HA, Lambertini C, van Vugt HH, Barzaghi-Rinaudo P, Schafer J, Hillenbrand R, et al. Monoclonal antibodies against the human somatostatin receptor subtypes 1-5: development and immunohistochemical application in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology.* 2012;95(3):232-47.

136. Wildemberg LE, Neto LV, Costa DF, Nasciuti LE, Takiya CM, Alves LM, et al. Low somatostatin receptor subtype 2, but not dopamine receptor subtype 2 expression predicts the lack of biochemical response of somatotropinomas to treatment with somatostatin analogs. *J Endocrinol Invest.* 2013;36(1):38-43.

137. Gatto F, Feelders RA, van der Pas R, Kros JM, Waaijers M, Sprij-Mooij D, et al. Immunoreactivity score using an anti-sst2A receptor monoclonal antibody strongly predicts the biochemical response to adjuvant treatment with somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(1):E66-71.

138. Wildemberg LE, Vieira Neto L, Costa DF, Nasciutti LE, Takiya CM, Alves LM, et al. Validation of immunohistochemistry for somatostatin receptor subtype 2A in human somatotropinomas: comparison between quantitative real time RT-PCR and immunohistochemistry. *J Endocrinol Invest.* 2012;35(6):580-4.

139. Takei M, Suzuki M, Kajiya H, Ishii Y, Tahara S, Miyakoshi T, et al. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor (SSTR) subtypes 2A and 5 in pituitary adenoma from acromegalic patients: good correlation with preoperative response to octreotide. *Endocr Pathol.* 2007;18(4):208-16.

140. Ferone D, de Herder WW, Pivonello R, Kros JM, van Koetsveld PM, de Jong T, et al. Correlation of in vitro and in vivo somatotrophic adenoma responsiveness to somatostatin analogs and dopamine agonists with immunohistochemical evaluation of somatostatin and dopamine receptors and electron microscopy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1412-7.



141. Melmed S, Cook D, Schopohl J, Goth MI, Lam KS, Marek J. Rapid and sustained reduction of serum growth hormone and insulin-like growth factor-1 in patients with acromegaly receiving lanreotide Autogel therapy: a randomized, placebo-controlled, multicenter study with a 52 week open extension. *Pituitary*. 2010;13(1):18-28.
142. Sherlock M, Woods C, Sheppard MC. Medical therapy in acromegaly. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(5):291-300.
143. Colao A, Auriemma RS, Pivonello R. The effects of somatostatin analogue therapy on pituitary tumor volume in patients with acromegaly. *Pituitary*. 2016;19(2):210-21.
144. Paragliola RM, Corsello SM, Salvatori R. Somatostatin receptor ligands in acromegaly: clinical response and factors predicting resistance. *Pituitary*. 2017;20(1):109-15.
145. Venegas-Moreno E, Flores-Martinez A, Dios E, Vazquez-Borrego MC, Ibanez-Costa A, Madrazo-Atutxa A, et al. E-cadherin expression is associated with somatostatin analogue response in acromegaly. *J Cell Mol Med*. 2019;23(5):3088-96.
146. Fougner SL, Lekva T, Borota OC, Hald JK, Bollerslev J, Berg JP. The expression of E-cadherin in somatotroph pituitary adenomas is related to tumor size, invasiveness, and somatostatin analog response. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2334-42.
147. Peverelli E, Treppiedi D, Giardino E, Vitali E, Lania AG, Mantovani G. Dopamine and Somatostatin Analogues Resistance of Pituitary Tumors: Focus on Cytoskeleton Involvement. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:187.
148. Iacovazzo D, Carlsen E, Lugli F, Chiloiro S, Piacentini S, Bianchi A, et al. Factors predicting pasireotide responsiveness in somatotroph pituitary adenomas resistant to first-generation somatostatin analogues: an immunohistochemical study. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(2):241-50.
149. Fougner SL, Borota OC, Berg JP, Hald JK, Ramm-Petersen J, Bollerslev J. The clinical response to somatostatin analogues in acromegaly correlates to the somatostatin receptor subtype 2a protein expression of the adenoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68(3):458-65.
150. Casarini AP, Pinto EM, Jallad RS, Giorgi RR, Giannella-Neto D, Bronstein MD. Dissociation between tumor shrinkage and hormonal response during somatostatin analog treatment in an acromegalic patient: preferential expression of somatostatin receptor subtype 3. *J Endocrinol Invest*. 2006;29(9):826-30.
151. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2011;63(1):182-217.

152. Ben-Shlomo A, Liu NA, Melmed S. Somatostatin and dopamine receptor regulation of pituitary somatotroph adenomas. *Pituitary*. 2017;20(1):93-9.
153. Colao A, Pivonello R, Di Somma C, Savastano S, Grasso LF, Lombardi G. Medical therapy of pituitary adenomas: effects on tumor shrinkage. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009;10(2):111-23.
154. Fitzgerald P, Dinan TG. Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J Psychopharmacol*. 2008;22(2 Suppl):12-9.
155. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*. 2001;22(6):724-63.
156. Bankowski BJ, Zacur HA. Dopamine agonist therapy for hyperprolactinemia. *Clin Obstet Gynecol*. 2003;46(2):349-62.
157. Rains CP, Bryson HM, Fitton A. Cabergoline. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation. *Drugs*. 1995;49(2):255-79.
158. Barlier A, Jaquet P. Quinagolide--a valuable treatment option for hyperprolactinaemia. *Eur J Endocrinol*. 2006;154(2):187-95.
159. Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res*. 2004;24(3):165-205.
160. Cho DI, Zheng M, Kim KM. Current perspectives on the selective regulation of dopamine D(2) and D(3) receptors. *Arch Pharm Res*. 2010;33(10):1521-38.
161. Trott G, Pereira-Lima JF, Leaes CG, Ferreira NP, Barbosa-Coutinho LM, Oliveira MC. Abundant immunohistochemical expression of dopamine D2 receptor and p53 protein in meningiomas: follow-up, relation to gender, age, tumor grade, and recurrence. *Braz J Med Biol Res*. 2015;48(5):415-9.
162. Soukup J, Kasparova P, Kohout A, Rychly B, Skarkova V, Syrucek M, et al. Evaluation of expression of somatostatin receptor 1, 2, 3, 5 and dopamine D2 receptor in spindle cell oncocytoomas of posterior pituitary. *Pituitary*. 2019;22(1):70-8.
163. Prou D, Gu WJ, Le Crom S, Vincent JD, Salamero J, Vernier P. Intracellular retention of the two isoforms of the D(2) dopamine receptor promotes endoplasmic reticulum disruption. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 19):3517-27.
164. Saveanu A, Jaquet P, Brue T, Barlier A. Relevance of coexpression of somatostatin and dopamine D2 receptors in pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286(1-2):206-13.

165. Wood DF, Johnston JM, Johnston DG. Dopamine, the dopamine D2 receptor and pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1991;35(6):455-66.
166. Zatelli MC, Piccin D, Tagliati F, Bottoni A, Ambrosio MR, Margutti A, et al. Dopamine receptor subtype 2 and somatostatin receptor subtype 5 expression influences somatostatin analogs effects on human somatotroph pituitary adenomas in vitro. *J Mol Endocrinol*. 2005;35(2):333-41.
167. Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Buchfelder M, Fahlbusch R, Lancranjan L. Dopamine D2 receptor gene expression in human adenohypophysial adenomas. *Endocrine*. 2001;14(3):329-36.
168. Wang Y, Li J, Tohti M, Hu Y, Wang S, Li W, et al. The expression profile of Dopamine D2 receptor, MGMT and VEGF in different histological subtypes of pituitary adenomas: a study of 197 cases and indications for the medical therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014;33:56.
169. Pawlikowski M. Immunohistochemical detection of dopamine D2 receptors in human pituitary adenomas. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;48(3):394-7.
170. Saveanu A, Sebag F, Guillet B, Archange C, Essamet W, Barlier A, et al. Targeting dopamine receptors subtype 2 (D2DR) in pheochromocytomas: head-to-head comparison between in vitro and in vivo findings. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):E1951-5.
171. Cooper O, Greenman Y. Dopamine Agonists for Pituitary Adenomas. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:469.
172. Colao A, Hofland LJ. The role of somatostatin and dopamine receptors as molecular targets for the treatment of patients with pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2007;156 Suppl 1:S1.
173. Sandret L, Maison P, Chanson P. Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(5):1327-35.
174. Abs R, Verhelst J, Maiter D, Van Acker K, Nobels F, Coolens JL, et al. Cabergoline in the treatment of acromegaly: a study in 64 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(2):374-8.
175. Howlett TA, Willis D, Walker G, Wass JA, Trainer PJ, Group UKARS. Control of growth hormone and IGF1 in patients with acromegaly in the UK: responses to medical treatment with somatostatin analogues and dopamine agonists. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(5):689-99.

176. Cozzi R, Attanasio R, Lodrini S, Lasio G. Cabergoline addition to depot somatostatin analogues in resistant acromegalic patients: efficacy and lack of predictive value of prolactin status. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;61(2):209-15.
177. Colao A, Filippella M, Pivonello R, Di Somma C, Faggiano A, Lombardi G. Combined therapy of somatostatin analogues and dopamine agonists in the treatment of pituitary tumours. *Eur J Endocrinol*. 2007;156 Suppl 1:S57-63.
178. Selvarajah D, Webster J, Ross R, Newell-Price J. Effectiveness of adding dopamine agonist therapy to long-acting somatostatin analogues in the management of acromegaly. *Eur J Endocrinol*. 2005;152(4):569-74.
179. Pecina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*. 2003;3(1):17.
180. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3756-88.
181. Bhatt T, Rizvi A, Batta SP, Kataria S, Jamora C. Signaling and mechanical roles of E-cadherin. *Cell Commun Adhes*. 2013;20(6):189-99.
182. David JM, Rajasekaran AK. Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. *Cancer Res*. 2012;72(12):2917-23.
183. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J*. 2012;31(12):2714-36.
184. Kourtidis A, Ngok SP, Anastasiadis PZ. p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;116:409-32.
185. Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, Clarkson A, Cook RJ, Little NS, et al. Nuclear accumulation of e-cadherin correlates with loss of cytoplasmic membrane staining and invasion in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1436-42.
186. Chauvet N, Romano N, Meunier AC, Galibert E, Fontanaud P, Mathieu MN, et al. Combining Cadherin Expression with Molecular Markers Discriminates Invasiveness in Growth Hormone and Prolactin Pituitary Adenomas. *J Neuroendocrinol*. 2016;28(2):12352.
187. Xu B, Sano T, Yoshimoto K, Yamada S. Downregulation of E-cadherin and its undercoat proteins in pituitary growth hormone cell adenomas with prominent fibrous bodies. *Endocr Pathol*. 2002;13(4):341-51.
188. Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Asa SL, Yamada S, Mizusawa N, et al. Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin)

genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol*.

2007;20(12):1269-77.

189. Mendes GA, Haag T, Trott G, Rech C, Ferreira NP, Oliveira MC, et al. Expression of E-cadherin, Slug and NCAM and its relationship to tumor invasiveness in patients with acromegaly. *Braz J Med Biol Res*. 2017;51(2):e6808.

190. Ferber EC, Kajita M, Wadlow A, Tobiansky L, Niessen C, Ariga H, et al. A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *J Biol Chem*.

2008;283(19):12691-700.

191. Zhao Y, Yu T, Zhang N, Chen J, Zhang P, Li S, et al. Nuclear E-Cadherin Acetylation Promotes Colorectal Tumorigenesis via Enhancing beta-Catenin Activity. *Mol Cancer Res*. 2019;17(2):655-65.

192. Su YJ, Chang YW, Lin WH, Liang CL, Lee JL. An aberrant nuclear localization of E-cadherin is a potent inhibitor of Wnt/beta-catenin-elicited promotion of the cancer stem cell phenotype. *Oncogenesis*. 2015;4:e157.

193. Zhou K, Jin H, Luo Y. Expression and significance of E-cadherin and beta-catenins in pituitary adenoma. *Int J Surg Pathol*. 2013;21(4):363-7.

194. Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH. Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol*. 1998;18(2):978-88.

195. UniProt: O00170 (AIP\_HUMAN) [Available from:

<https://www.uniprot.org/uniprot/O00170>.

196. OMIM: 605555 - ARYL HYDROCARBON RECEPTOR-INTERACTING PROTEIN; AIP: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM); [Available from:

<https://www.omim.org/entry/605555>.

197. Noakes R. The aryl hydrocarbon receptor: a review of its role in the physiology and pathology of the integument and its relationship to the tryptophan metabolism. *Int J Tryptophan Res*. 2015;8:7-18.

198. Lloyd C, Grossman A. The AIP (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein) gene and its relation to the pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocrine*. 2014;46(3):387-96.

199. Jaffrain-Rea ML, Rotondi S, Turchi A, Occhi G, Barlier A, Peverelli E, et al. Somatostatin analogues increase AIP expression in somatotropinomas, irrespective of Gsp mutations. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(5):753-66.

200. Denes J, Kasuki L, Trivellin G, Colli LM, Takiya CM, Stiles CE, et al. Regulation of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) protein expression by MiR-34a in sporadic somatotropinomas. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117107.
201. Daly A, Cano DA, Venegas E, Petrossians P, Dios E, Castermans E, et al. AIP and MEN1 mutations and AIP immunohistochemistry in pituitary adenomas in a tertiary referral center. *Endocr Connect*. 2019.
202. Ozkaya HM, Comunoglu N, Sayitoglu M, Keskin FE, Firtina S, Khodzhaev K, et al. Germline mutations of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) gene and somatostatin receptor 1-5 and AIP immunostaining in patients with sporadic acromegaly with poor versus good response to somatostatin analogues. *Pituitary*. 2018;21(4):335-46.
203. Kasuki L, Vieira Neto L, Wildemberg LE, Colli LM, de Castro M, Takiya CM, et al. AIP expression in sporadic somatotropinomas is a predictor of the response to octreotide LAR therapy independent of SSTR2 expression. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(3):L25-9.
204. Maione L, Chanson P. National acromegaly registries. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2019;33(2):101264.
205. Potorac I, Petrossians P, Daly AF, Schillo F, Ben Slama C, Nagi S, et al. Pituitary MRI characteristics in 297 acromegaly patients based on T2-weighted sequences. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(2):169-77.
206. Ciresi A, Amato MC, Pivonello R, Nazzari E, Grasso LF, Minuto F, et al. The metabolic profile in active acromegaly is gender-specific. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(1):E51-9.
207. Tanaka S, Fukuda I, Hizuka N, Takano K. Gender differences in serum GH and IGF-I levels and the GH response to dynamic tests in patients with acromegaly. *Endocr J*. 2010;57(6):477-83.
208. Colao A, Pivonello R, Cappabianca P, Briganti F, Tortora F, Auriemma RS, et al. Effect of gender and gonadal status on the long-term response to somatostatin analogue treatment in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;63(3):342-9.
209. Petrossians P, Daly AF, Natchev E, Maione L, Blijdorp K, Sahnoun-Fathallah M, et al. Acromegaly at diagnosis in 3173 patients from the Liege Acromegaly Survey (LAS) Database. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(10):505-18.
210. Trouillas J, Jaffrain-Rea ML, Vasiljevic A, Raverot G, Roncaroli F, Villa C. How to Classify the Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).

211. Neou M, Villa C, Armignacco R, Jouinot A, Raffin-Sanson ML, Septier A, et al. Pangenomic Classification of Pituitary Neuroendocrine Tumors. *Cancer Cell*. 2020;37(1):123-34 e5.
212. Horvath E, Kovacs K, Smyth HS, Killinger DW, Scheithauer BW, Randall R, et al. A novel type of pituitary adenoma: morphological features and clinical correlations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66(6):1111-8.
213. Delgrange E, Vasiljevic A, Wierinckx A, Francois P, Jouanneau E, Raverot G, et al. Expression of estrogen receptor alpha is associated with prolactin pituitary tumor prognosis and supports the sex-related difference in tumor growth. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(6):791-801.
214. Zafar M, Ezzat S, Ramyar L, Pan N, Smyth HS, Asa SL. Cell-specific expression of estrogen receptor in the human pituitary and its adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(12):3621-7.
215. Kasuki L, Wildemberg LE, Neto LV, Marcondes J, Takiya CM, Gadelha MR. Ki-67 is a predictor of acromegaly control with octreotide LAR independent of SSTR2 status and relates to cytokeratin pattern. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(2):217-23.
216. Lekva T, Berg JP, Fougner SL, Olstad OK, Ueland T, Bollerslev J. Gene expression profiling identifies ESRP1 as a potential regulator of epithelial mesenchymal transition in somatotroph adenomas from a large cohort of patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(8):E1506-14.
217. Chetty R, Serra S. Nuclear E-cadherin immunoexpression: from biology to potential applications in diagnostic pathology. *Adv Anat Pathol*. 2008;15(4):234-40.
218. Lobo J, Petronilho S, Newell AH, Coach J, Harlow G, Cruz A, et al. E-cadherin clone 36 nuclear staining dictates adverse disease outcome in lobular breast cancer patients. *Mod Pathol*. 2019;32(11):1574-86.
219. Horiguchi K, Yamada M, Umezawa R, Satoh T, Hashimoto K, Tosaka M, et al. Somatostatin receptor subtypes mRNA in TSH-secreting pituitary adenomas: a case showing a dramatic reduction in tumor size during short octreotide treatment. *Endocr J*. 2007;54(3):371-8.
220. Reubi JC, Waser B, Cescato R, Gloor B, Stettler C, Christ E. Internalized somatostatin receptor subtype 2 in neuroendocrine tumors of octreotide-treated patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2343-50.
221. Horvath E, Kovacs K. Pathology of acromegaly. *Neuroendocrinology*. 2006;83(3-4):161-5.

222. Lv L, Jiang Y, Yin S, Hu Y, Chen C, Ma W, et al. Mammosomatotroph and mixed somatotroph-lactotroph adenoma in acromegaly: a retrospective study with long-term follow-up. *Endocrine*. 2019;66(2):310-8.
223. Ezzat S, Horvath E, Harris AG, Kovacs K. Morphological effects of octreotide on growth hormone-producing pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(1):113-8.
224. Torlakovic EE. Fit-for-Purpose Immunohistochemical Biomarkers. *Endocr Pathol*. 2018;29(2):199-205.
225. Kasuki L, Dalmolin MD, Wildemberg LE, Gadelha MR. Treatment escape reduces the effectiveness of cabergoline during long-term treatment of acromegaly in monotherapy or in association with first-generation somatostatin receptor ligands. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018;88(6):889-95.